Über die Gewinnung von Gewebekulturen von Dioscorea composita Hemsl. und Solanum laciniatum Ait. (Syn. aviculare Forst.) und Untersuchung des Steroid-Gehaltes in intakten Pflanzen und im Kallus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ursula Grabow

aus Pritzwalk

1968

Über die Gewinnung von Gewebekulturen von Dioscorea composita Hemsl. und Solanum laciniatum Ait. (Syn. aviculare Forst.) und Untersuchung des Steroid-Gehaltes in intakten Pflanzen und im Kallus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ursula Grabow

aus Pritzwalk

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof. Dr. J. Reinert
2. Referent: Prof. Dr. Th. Eckardt

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 6. 1968
Tag der Promotion: 29. JULI 1968

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1 - 4
Material und Methode	5 - 13
I. Dioscorea composita Hemsl.	5 - 10
II. Solanum laciniatum Ait(Syn. aviculare)	11 - 13
Ergebnisse	14 - 45
I. Dioscorea composita Hemsl.	14 - 31
II. Solanum laciniatum Ait. (Syn. aviculare)	32 - 45
Diskussion	46 - 54
Zusammenfassung	55 - 57
Literatur-Verzeichnis	58 - 65
Abbildungen (graphische Darstellungen)	66 - 94
Bilder (Photographien)	95 -117

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546510_0028

Einleitung

Gewebekulturen, die durch wuchsstoffbedingte Kallusbildung an zuvor völlig ausdifferenzierten Pflanzenorganen, wie Sprossen, Blättern und Wurzeln erhalten werden, zeigen einen Rückgang in den embryonalen Zustand, also eine Rückdifferenzierung. Zunächst waren Kulturzellen als um so weniger differenziert erschienen, je besser sie - dank stetig verbesserter Kulturtechnik - wuchsen. Sie galten allgemein als entdifferenziert. Dabei wird eingeräumt, daß es sich nicht um eine fehlende, sondern um eine verzögerte Differenzierung handelt. Denn im anfangs aus parenchymatischen Zellen aufgebauten Kallus treten nach längerer Kulturdauer Tracheiden auf, und es werden Wurzeln und Sprosse gebildet. Neben diesen morphogenetischen Differenzierungsleistungen wurden neuerdings funktionelle Differenzierungen beobachtet, die besonders auf dem Gebiet des Sekundärstoffwechsels liegen.Unter den sekundären Pflanzenstoffen sind es besonders die Alkaloide und Steroide, denen wegen ihres breiten Anwendungsbereiches in der Medizin ganz besondere Bedeutung zukommt. Daher seien von Gewebekulturen, in denen in den jüngsten Arbeiten Sekundärprodukte nachgewiesen werden konnten, die alkaloid- und steroidhaltigen genannt: CHAN und STABA (1964) fanden in Datura-Kulturen bis zu 0,11% Gesamtalkaloid, vor allem an Hyoscin. Bei der weiteren Suche nach Alkaloid-Vorkommen in Gewebekulturen wurden in der Mitte der sechziger Jahre positive Ergebnisse erzielt. SPEAKE und Mitarbeitern gelang 1964 die erfolgreiche Isolierung von Nikotin aus Zellkulturen von Stengel-, Blatt- und Wurzelgeweben des Tabaks in Konzentrationen von 0,1 µg/mg Trockensubstanz. Die Verfasser schlossen, daß diese Gewebe offenbar auch

in vitro zur Nikotinbildung befähigt seien. Ebenfalls aus Gewebekulturen von Nicotiana tabacum isolierten BENVENISTE, HIRTH und OURISSON (1966) ein ganzes Spektrum von Steroiden: Campesterin, β-Sitosterin, Stigmasterin, Cycloartenol, 24-Methylencycloartenol und 28-Nor-Citrostadienol wurden identifiziert.

WILLIAMS und GOODWIN (1965) untersuchten als biochemischen Beitrag zur Klärung der pflanzlichen Zelldifferenzierung die Zusammensetzung der Terpenoide in Gewebekulturen der "Paul's Scarlet"-Rose und zum Vergleich dazu die entsprechenden Inhaltsstoffe intakter Pflanzenorgane. In der Verteilung der Triterpene (hauptsächlich β-Sitosterin neben Spuren von "γ-Sitosterin" sowie Stigmasterin, Lanosterin, α-Amyrin und Squalen) unterschieden sich diese Gewebekulturen nicht von intakten Organen.

Gewebekulturen, die die Fähigkeit zur Steroidsynthese beibehalten, liefern das günstigste Versuchsmaterial für die Aufklärung der Biosynthese eben dieser Sekundärprodukte. Mit Tabakgewebekulturen, die mit radioaktiv markiertem 1-^{14}C-Acetat gefüttert wurden, erzielte die Arbeitsgruppe BENVENISTE, HIRTH und OURSSON (1964 und 1966) und ebenso BENVENISTE, DURR, HIRTH und OURISSON (1964) bereits die ersten Ergebnisse. Die Resultate stellen sowohl die Schritte des Biosyntheseweges als auch die Synthesebedingungen klar heraus.

Die Fütterung von Vorstufen, allerdings nicht zwangsläufig mit markierten Substanzen, läßt sich auch für die Forderungen der angewandten Forschung zielgerichtet einsetzen. Es kann z.B. die Absicht verfolgt werden, mit Hilfe von Steroid-Precursoren den Steroid-Spiegel der Gewebekulturen anzuheben und somit die Steroid-Ausbeute zu erhöhen.

Mit der grundsätzlichen Möglichkeit der Gewinnung steroidhaltiger Gewebekulturen ergibt sich zugleich die Möglichkeit, eine neue Steroidquelle zu erschließen, nämlich von der Freilandkultur steroidhaltiger Pflanzen auf Gewebekulturen überzugehen und somit unabhängig von der Vegetationsperiode, Schädlingsbefall und Witterungseinflüssen zu werden.

Es darf nicht unbeachtet bleiben, daß alle erwähnten Erfolge, die auf dem Gebiete der sekundären Pflanzenstoffe mit Hilfe der Gewebekulturzüchtung gelangen, an Gewebekulturen von dicotyledonen Pflanzen erzielt worden sind. Die Anlage von Gewebekulturen der Monocotyledonen bereitet dagegen erhebliche Schwierigkeiten. GAUTHERET führte 1959 in einer tabellarischen Aufstellung neun Monocotylen-Gattungen, vertreten durch 12 Arten, an, mit denen die Bemühungen, Gewebekulturen zu gewinnen, erfolgreich waren. Diesen stehen gegenüber 59 Dicotyledonen-Gattungen mit insgesamt 74 Arten. Es ist also prinzipiell möglich, an jeder vorkommenden zweikeimblättrigen Pflanze Kalluswachstum zu induzieren. Dagegen scheint es generell schwieriger zu sein, Gewebekulturen von Monocotyledonen zu erhalten. Seit neuerem wird als hinzukommendes Objekt zu den bei GAUTHERET erwähnten lediglich das Fruchtfleisch der Banane 1964 von RAM und STEWARD genannt. Die an den von YAMADA 1963 an den Tradescantia-Arten T.reflexa und T.palludosa ließen sich nicht ohne Knospenbildung subkultivieren.

Bis auf Mais (Zea mays), der über das native Kinin Zeatin verfügt (LETHAM, SHANNON, Mc DONALD, 1964), sind sämtliche Gewebekulturen von Monocotyledonen auf die Zufuhr von kininhaltiger Cocosnußmilch angewiesen.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, von steroidhaltigen Pflanzen zur Steroidsynthese befähigte Gewebekulturen zu gewinnen, für die ein synthetisches, volldefiniertes Nährmedium entwickelt werden sollte. Als Objekte dienten die Diosgenin-haltige Dioscoreaceae Dioscorea composita Hemsl. und die über das Alkaloid-Steroid Solasodin verfügende Solanaceae Solanum laciniatum Ait. (Syn. aviculare Forst.). Das Hauptgewicht wurde auf die Versuche mit der monocotyledonen Dioscorea gelegt.

Material und Methode:

Die Anzucht, Kulturbedingungen und Aufarbeitung seien für die beiden Versuchsobjekte Dioscorea composita Hemsl. und Solanum laciniatum Ait. (Syn. aviculare Forst.) getrennt behandelt:

I. Dioscorea composita

Für die Untersuchungen standen ein- und mehrjährige Knollen und Samen von Dioscorea composita zur Verfügung.

1. Behandlung der Knollen:

Die Knollen wurden von den Adventivwurzeln befreit, gewaschen, geschabt und nochmals mit Leitungswasser abgespült, anschließend eine Stunde mit Natriumhypochloritlösung (2% Gehalt an freiem Chlor) behandelt. Danach wurden sie gründlich mit sterilem Wasser (3 x mit je 500 ml) gespült und aseptisch präpariert.

Die Explantate waren quaderförmig und hatten eine Größe von 0,5 cm Höhe und 1,0 cm Länge und Breite.

Die Stücke wurden zur Auslösung der Kallusbildung auf Agarnährböden mit verschiedenen Wuchsstoff- und anderen Zusatzkomponenten kultiviert. Es wurden die 1943 von WHITE (BMW), 1953 von HELLER (BMH) und 1962 von MURASHIGE und SKOOG (BMS) entwickelten Basalmedien verwendet. (Über die Modifizierung durch Wuchsstoffe und andere Zusatzkomponenten s.die entsprechenden Angaben im Kapitel Ergebnisse).

Alle Nährböden wurden bei 1 atü 20 Minuten autoklaviert,

jedoch aminosäurehaltige Nährmedien (mit der Aminosäuren-Zusammensetzung nach TORREY und REINERT, 1961) dreimal an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 20 Minuten im strömenden Dampf sterilisiert.

2. Behandlung der Samen:

Aus Samen wurden nach 24-stündiger Desinfektion mit Natriumhypochloritlösung (Gehalt an freiem Chlor 1%) und anschließendem gründlichen Spülen (dreimal mit je 500 ml sterilen Wassers) Keimpflanzen bei 28° C im Brutschrank in Petrischalen unter sterilen Bedingungen herangezogen. Die Samen keimten nach ca. 14 Tagen.

Die Keimlinge wurden auf wuchsstofffreie Agarnährböden (Basalmedien) überimpft und bei 28° C in völliger Dunkelheit oder im 12 : 12 Stdn.-Licht/Dunkel-Rhythmus, bei 2000 Lux in der Lichtperiode, herangezogen und dann aseptisch präpariert.

Von Lichtkeimlingen wurden Blätter mit und ohne Blattstiel explantiert und auf wuchsstoffhaltigen Kallusinduktionsmedien subkultiviert.

Von den Dunkelkeimlingen wurde im Alter von acht Wochen der Vegetationskegel zusammen mit dem hypocotylen Glied (Vp + Hyp) isoliert und auf die Induktionsmedien überimpft (s.Abb.1).

In anderen Versuchen wurde von vierzehn Tage alten Keimpflanzen die ein bis zwei Zentimeter lange Radicula explantiert und aus den Petrischalen direkt auf das Kallusinduktionsmedium gebracht, oder die intakte Keimpflanze wurde unmittelbar nach der Keimung der Wuchsstoffwirkung ausgesetzt. Die Kultur erfolgte ebenfalls bei 28° C im Dauerdunkel oder im Licht/Dunkel-Rhythmus

(12 : 12 Stdn., 2000 Lux in der Lichtperiode). Die unter diesen Bedingungen an den behandelten Keimpflanzen entstandenen Kalli wurden explantiert und alle vier Wochen auf neues Medium übertragen.

Bestimmung des Wachstums:

Das Wachstum der Wurzel-Explantate, der intakten Keimpflanzen und der Kalli wurde durch Frisch- und Trockengewichtsbestimmungen erfaßt. Die Messungen erfolgten an jeweils zwei parallelen Ansätzen mit je zehn Proben. Bei allen angegebenen Daten handelt es sich somit um Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen. In den meisten Ansätzen wurden Ausgangs- und Endgewicht während einer vierwöchigen Kulturdauer bestimmt.

In Versuchen, in denen geprüft werden sollte, ob die Wachstumsgeschwindigkeit des Kallusgewebes konstant bleibt oder sich steigert, wurden die Frischgewichtszunahmen über längere Zeiträume kontrolliert. Dazu wurden unter aseptischen Bedingungen Einwaagen von ca. 100 mg Anfangsgewicht vorgenommen und nach vier Wochen ausgewogen. Anschließend wurde von dem herangewachsenen Kallus wiederum ein Inoculum von etwa 100 mg Frischgewicht entnommen und nach weiteren vier Wochen erneut der Zuwachs bestimmt und so fort. Auch in diesem Falle wurden jeweils zehn Einzelwägungen aus zwei Parallel-Ansätzen zusammengefaßt.

Bestimmung des Diosgenin:

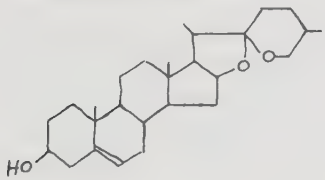
Die Diosgenin-Bestimmung wurde nach einer Labor-Vorschrift der Firma SCHERING durchgeführt: Danach werden 200 mg pulverisierte Trockensubstanz des zu analysierenden

Pflanzenmaterials mit 2 n HCl drei Stunden unter Rückfluß gekocht, filtriert und mit 5%iger Natriumbikarbonatlösung und Wasser neutral gewaschen. Der getrocknete Rückstand wird mit 100 ml Petroläther (Kp. 60 - 80°) über Nacht (24 Stdn.) bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dem Abfiltrieren wird die Lösung zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 1 ml Chloroform gelöst. Die Lösung wird zur Dünnschichtchromatographie verwendet und auf Kieselgel-G-Platten nach STAHL (1962) in abgestuften Mengen von 10 bis 100 µl aufgetragen. Parallel dazu werden verschiedene Mengen (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 und 10,0 γ) Diosgenin-Reinsubstanz aufgetragen. Sowohl die aufzutragende Extraktmenge als auch die Quantitäten des Standards müssen in einem Vorversuch ermittelt werden. Sie sind abhängig vom Diosgenin-Gehalt des Extrakts.

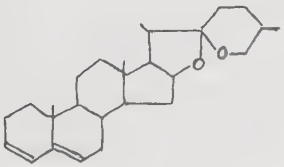
Als Laufmittel dient ein Gemisch von Äther/Benzol = 50 + 50 ml. Die Laufzeit beträgt ca. 25 Minuten. Die Chromatogramme werden mit p-Toluolsulfosäure (20 g in 100 ml Äthanol) angefärbt und 15 Minuten bei 120° C entwickelt. Unter der UV-Lampe (bei 366 mµ Wellenlänge) werden die blau fluoreszierenden Diosgenin-Flecken der aufgetragenen Reinsubstanz mit dem aufgetrennten Extrakt verglichen, und aus der Fleckengröße und Farbintensität der sich entsprechenden Flecken wird die Diosgenin-Menge des Extraktes abgeschätzt. Durch Umrechnung auf die Gesamtmenge des Extrakts und der darin enthaltenen Trockensubstanz wird sodann der Diosgenin-Gehalt (bezogen auf das Trockengewicht) ermittelt. Im Analysengang wurden 200 mg Trockensubstanz aufgearbeitet, in denen durchschnittlich 0,1 γ Diosgenin/mg Trockengew., also 20 γ pro Gesamttrockengewicht, nachgewiesen werden konnten.

Die Analysenergebnisse erlauben sichere Schlüsse in

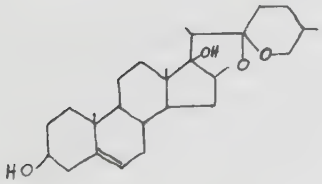
qualitativer Hinsicht. Bei den quantitativen Angaben bleibt zu beachten, daß nach der hier angewandten Methode nur ein Teil des tatsächlich vorhandenen Diosgenin erfaßt werden kann. Denn während der Analyse erfolgen Umlagerungen am Diosgenin-Molekül. Während der Hydrolyse werden 10% des Diosgenin zu Pennogenin (= 17-Hydroxy -Diosgenin) umgebaut. Außerdem entsteht $\Delta^{3,5}$-Spirostadien (s.Formeln, unten). Diese Umlagerungen lassen sich nicht vermeiden. Selbst milderere Hydrolyse (1 Std. an Stelle von 3 Stdn.) führte in Untersuchungen von BEDOUR, MUNAJJED, FAYEZ und GIRGIS (1964) in einer Ausbeute von 18% zur Bildung von $\Delta^{3,5}$-Spirostadien aus Diosgenin-Reinsubstanz. Diese Ergebnisse können durch eigene Versuche mit Diosgenin-Standard bestätigt werden.



Diosgenin



$3,5$-Spirostadien



Pennogenin

Die Gegenüberstellung der Formelbilder von Diosgenin, Pennogenin und $\Delta^{3,5}$-Spirostadien verdeutlicht den Unterschied im Bau der Moleküle: Das Pennogenin ist an C 17 hydroxyliert und als 17-Hydroxy-Diosgenin aufzufassen, und im $\Delta^{3,5}$-Spirostadien ist an Stelle der OH-Gruppe im Diosgenin an C 3 eine Doppelbindung eingeführt. Diese Differenzen fallen weder für die biologische Seite der Aufgabenstellung noch für die angewandte Richtung ins Gewicht: Beide fordern zur Steroidsynthese befähigte Gewebekulturen, wobei letztere hauptsächlich an dem Steran-Gerüst interessiert ist, an dem anschließend spezifische Umlagerungen ohne weiteres durchgeführt werden können.

II. Solanum laciniatum Ait. (Syn. aviculare Forst.)

1. Anzucht und Behandlung des Pflanzenmaterials:

Die Versuchspflanzen wurden unter sterilen Bedingungen aus Samen herangezogen. Die Aufzucht erfolgte nach einstündiger Behandlung des Samenmaterials mit Natriumhypochlorit (0,5% Chlor) und anschließendem gründlichen Spülen (3 x 500 ml) mit sterilem Aqua dest. in Petrischalen auf angefeuchtetem Filtrierpapier.

Die Samen keimten im Brutschrank bei 28° C im Dunkeln nach acht Tagen. Sodann wurden die Keimlinge auf Agarnährböden ohne Wuchsstoff (BMS) gebracht und bei 28° C im 12 : 12 Stdn.-Licht/Dunkel-Rhythmus (2000 Lux während der Lichtperiode) herangezogen.

Für die Induktion der Kallusbildung wurden von sechs Wochen alten Pflanzen das Hypocotyl und die beiden ersten Folgeblätter aseptisch entfernt und auf wuchsstoffhaltige Nährböden gebracht (Zusammensetzung der Nährmedien s. im Kapitel Ergebnisse).

2. Bestimmung des Wachstums:

Das Wachstum der Blatt- und Hypocotyl-Explantate wurde durch Wägung des Frisch- und Trockengewichtes erfaßt. Die Messungen erfolgten an jeweils zwei parallelen Ansätzen mit je zehn Proben. Bei allen angegebenen Daten handelt es sich somit um Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen. Zur Bestimmung des Kalluswachstums wurden unter aseptischen Bedingungen ca. 100 mg Ausgangsgewebe eingewogen und am Ende der Versuchszeit (4 Wochen) der Zuwachs bestimmt.

3. Bestimmung des Solasodin:

Die Solasodin-Bestimmung erfolgte ebenfalls nach einer Labor-Vorschrift der Firma SCHERING. Im Analysengang wird die pulverisierte Solanum-Trockensubstanz mit 100 ml Methanol, das 0,37% an Ammoniak enthält, zwei Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen und Abfiltrieren wird mit 20 ml HCl versetzt, so daß die Lösung ca. 2 n an HCl ist und drei Stunden unter Rückfluß gekocht (Hydrolyse). Anschließend wird mit Ammoniak (37%) alkalisch gemacht und das Methanol abdestilliert. Nach dem Abkühlen wird die zurückbleibende wässr.trübe Flüssigkeit zweimal mit je 50 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt, die Methylenchloridextrakte vereinigt und 10 Minuten mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Filtrieren und Abdestillieren des Methylenchlorids wird der erhaltene Rückstand in Chloroform gelöst und zur Dünnschicht-Chromatographie verwendet. Der Extrakt wird in verschiedenen Mengen von 10 bis 100 µl auf Kieselgel-G-Platten aufgetragen. Als Laufmittel dient ein Gemisch von Methanol/Chloroform (10 + 90 ml). Die Laufzeit beträgt etwa 35 Minuten. Anschließend wird mit p-Toluolsulfosäure (20 g in 100 ml Äthanol) angefärbt und 20 Minuten bei 120° C entwickelt. Solasodin fluoresziert im UV-Licht bei 366 mµ gelb. Die Fleckengröße und Farbintensität der Probe werden mit den Flecken von verschiedenen Mengen Solasodin-Standard verglichen und daraus die Solasodinmenge pro aufgetragene Extraktmenge abgeschätzt. Aus diesen Daten läßt sich anschließend der Solasodin-Gehalt der analysierten Trockensubstanz berechnen. Auch in diesem Falle sind Mengen von 0,1γ Solasodin auf der Dünnschicht noch sichtbar. Jedoch sind, im Gegensatz zum Diosgenin-Nachweis,

im Solanum-Extrakt außer dem gesuchten Steroid-Alkaloid reichliche Mengen an Begleitsubstanzen enthalten, die die Auftrennung des Extraktes auf der Dünnschicht erschweren, oder, wenn es sich um größere Quantitäten handelt, verhindern. Aus diesem Grunde kann nur eine Menge von 20 bis 30 mg Solanum-Trockensubstanz analysiert werden (= 1/10 der Dioscorea-Substanz). Der nach dem Abdestillieren des Methylenchlorids erhaltene Rückstand ist mengenmäßig so groß, daß zwei oder sogar drei ml Chloroform benötigt werden, um ihn zu lösen. Da der Extrakt so stark verdünnt werden muß, können nur Solasodin-Mengen bis etwa 0,1 γ/mg Trockensubstanz erfaßt werden.

Ergebnisse:

I. Dioscorea composita.

1. Knollen:

Die Versuche, an ein- und mehrjährigen Knollen die Bildung von Kallus zu induzieren, blieben erfolglos, obwohl achtzehn verschiedene Nährböden getestet wurden. Die Basalmedien von WHITE (BMW) und HELLER (BMH) wurden mittels 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und Cocosnußmilch (CoM) verschiedener Konzentrationsstufen modifiziert. Während vierwöchiger Übertragungsperioden gelangten die Explantate fünfmal auf frische Nährböden. Nach einem halben Jahr wurde der Versuch abgebrochen, da keine Anzeichen von Proliferationen sichtbar waren.

2. Blätter:

An isolierten Blättern von Dioscorea composita blieben die Bemühungen, Kallusbildung hervorzurufen, ebenfalls vergeblich. Auf den durch 2,4-D und CoM modifizierten WHITE- und HELLER-Nährböden (ebenfalls in achtzehn verschiedenen Kombinationen) blieben die Blattexplantate (Blätter mit und ohne Blattstiel) zwei Monate lang unter Beobachtung. Innerhalb der Versuchszeit verlängerte sich der Blattstiel von 3 mm auf 10 mm. Kallusbildung trat nicht auf.

3. (Vp + Hyp)-Explantate:

Explantate des Vegetationskegels mit angrenzendem

Hypocotyl (Vp + Hyp) zeigten Veränderungen auf den 2,4-D- und CoM-haltigen Nährböden: Sie wuchsen und regenerierten Wurzeln. Vor allem durch Zusatz von Cocosnußmilch konnten die Frisch- und Trockengewichtszunahme deutlich gefördert werden (s.Abb. 4a und 4b).

Über die Beeinflussung der Differenzierung(hier Wurzelregeneration) gibt die Tabelle 1 Auskunft.

Tabelle 1: Wurzelbildung an Dioscorea composita -(Vp + Hyp)-Explantaten nach sechswöchiger Behandlung mit Auxin und Cocosnußmilch verschiedener Konzentrationen:

Medium	Anzahl d.Kulturen	Anzahl d.Kulturen m.Wurz. Anlage	Anzahl d.Kulturen m.Wurzeln	Gesamtzahl d.gebildeten Wurzeln
BMH+2,4-D,6×10^{-7}+18%CoM	9	-	-	-
" " +15%CoM	12	3	-	-
" " +10%CoM	10	2	1	5
" " + 5%CoM	9	-	4	12
" " ——	12	-	-	-
" —— ——	9	-	1	1
"+2,4- D,10^{-7} +18%CoM	12	1	5	12
" " 10^{-6} +18%CoM	10	-	1	1
" " 10^{-5} +18%CoM	17	-	-	-
BMW+2,4-D,6×10^{-7}+10%CoM	4	-	-	-
" " ——	9	-	-	-
" —— ——	9	-	4	13

Die Wurzelbildung wird offensichtlich durch geringe Auxinkonzentrationen ebenso wie durch niedrige CoM-Konzentrationen gefördert.

Das Ziel, differenziertes Wachstum zu unterdrücken und Kallusbildung zu induzieren, wurde mit hohen Auxin- in Verbindung mit ebenfalls hohen CoM-Konzentrationen erreicht. An den auf BMH + 2,4-D, 10^{-5}g/ml + 18% CoM gehaltenen Explantaten erschienen nach vierzehn Tagen glän-

zende, tropfenförmige Bildungen etwa in der Größe eines Ziersteckknadelkopfes, die den ersten Ansatz zur Kallusbildung darstellten. Denn mikroskopische Untersuchungen an Schnittpräparaten dieses Gewebes zeigten meristematische und parenchymatische Zellen, wie sie für Kallusgewebe typisch sind. Dieses kallöse Wachstum trat an 10% der Kulturen und bemerkenswerterweise nur an Kulturen, die zuvor Wurzeln regeneriert hatten, auf. Es handelt sich also um Wurzel-Kalli. Der Kallus entstand zumeist an der Spitze der Regeneratwurzeln, die mit dem Medium Kontakt hatte.

Auf Grund dieser Beobachtungen wurden in den nächstfolgenden Ansätzen die (Vp + Hyp)-Explantate vier Wochen auf Nährböden mit geringer Auxin-Konzentration und niedrigem CoM-Gehalt (BMH + 2,4-D, 10^{-7} g/ml + 5% CoM) zur Wurzelgeneration angeregt und anschließend zur Kallusinduktion auf das Medium BMH + 2,4-D, 10^{-5}g/ml + 18% CoM übertragen. Auf diese Weise wurde erreicht, daß der Prozentsatz der Kulturen, die Kallus bildeten, von 10% auf 38% anstieg.

Da die Regeneratwurzeln von Dioscorea composita so positiv auf Auxinbeeinflussung hoher Konzentration mit Kallusbildung reagierten, Blätter und Knollen hingegen keine Reaktion zeigten, dürften Wurzeln das günstigste Ausgangsmaterial sein. Es mußte geprüft werden, ob man auf die Regeneratwurzeln angewiesen ist, oder ob bereits die Radicula verwendet werden kann.

Deshalb wurde für die folgenden Ansätze die ein bis zwei Zentimeter lange Radicula vierzehn Tage alter Keimlinge abpräpariert und auf die Nährböden gebracht. Das Verhalten intakter Keimpflanzen wurde ebenfalls überprüft.

Als Testmedien dienten:

BMH + 2,4-D, 10^{-5}g/ml + 18% CoM
BMH + 2,4-D, 10^{-5}g/ml + 18% CoM + Phosphat *
BMH + 2,4-D, 10^{-5}g/ml ——— + Phosphat + 0,025% Hefe
BMH + 2,4-D, 10^{-5}g/ml ——— + Phosphat
BMH + 2,4-D, 10^{-5}g/ml + 18% CoM + 0,001% Mercaptoäthanol **

* Das Phosphat wurde als Na H_2 PO_4 in der Konzentration 8,5 x 10^{-5}g/ml verabreicht.

** Durch Zusatz von Mercaptoäthanol zum Kulturmedium sollte versucht werden, die in den vorhergehenden Versuchen häufig beobachtete, wahrscheinlich durch Polyphenoloxydasen bedingte, Braunfärbung der Objekte zu verhindern.

Auf jedes der fünf Testmedien wurden fünf intakte Keimlinge und fünf abpräparierte Keimwurzeln geimpft.

Eine erste Reaktion zeigte sich am sechsten Behandlungstag, indem die Sprosse der Keimpflanzen aufquollen. Die Wurzeln (intakte und isolierte) waren erst am 14.Versuchstag unter dem Einfluß des Auxins anfangs am Spitzenmeristem und später in ihren übrigen Teilen verdickt. Diese Verdickungen waren der erste Ansatz zur Kallusentstehung.

Es konnte also Kallusbildung angeregt werden, sowohl an den ganzen Keimpflanzen, als auch an den explantierten Keimwurzeln.

Durch die Proliferationen wurden starke Gewichtszunahmen erzielt. Die abpräparierten Wurzeln erreichten auf dem Medium BMH + 2,4-D, 10^{-5}g/ml + 18% CoM und BMH + 2,4-D, 10^{-5}g/ml + 18% CoM + Phosphat ca. das Zehn-

fache ihres Ausgangsgewichtes innerhalb von sechs Wochen. Denn das ursprüngliche Frischgewicht von 1,4 mg stieg auf dem ersten Medium auf 15,0 mg und bei zusätzlicher Phosphatgabe auf 16,4 mg an (s.Abb. 5a).

Auch bei den behandelten Keimlingen lagen die Gewichtszunahmen in derselben Größenordnung. Der Ausgangswert von 14,7 mg Frischgewicht wurde auf dem Nährboden BMH + 2,4-D,10^{-5}g/ml + 18% CoM + Phosphat durch den Zuwachs auf 114,8 mg Frischgewicht verachtfacht. Die beste Ausbeute, mit 157,9 mg Frischgewicht, ergab sich auf dem Medium BMH + 2,4-D,10^{-5}g/ml + 18% CoM + 0,001% Mercaptoäthanol (s.Abb. 5b).

Die Abbildungen 6a, 6b und 7a, 7b veranschaulichen die Ergebnisse einer zweiten Versuchsserie, bei der das Pflanzenmaterial auf ein Basalmedium nach MURASHIGE und SKOOG (BMS) mit verschiedenen Zusatzkomponenten gelangte. Da diese Kulturen im gleichen Zeitraum wie die auf dem HELLER'schen Nährboden gehaltenen angesetzt worden waren, handelt es sich um identisches Material und somit um vergleichbare Werte.

Während in der ersten Versuchsserie auf BMH (s.Abb.5) durch die hohe Auxinkonzentration von 10^{-5}g/ml jegliche Differenzierung unterdrückt wurde, entstanden auf dem BMS unter dem Einfluß der geringeren 2,4-D-Konzentration (10^{-6}g/ml) an den Wurzelexplantaten nach einer Woche Seitenwurzeln und an den intakten Keimpflanzen Sekundärwurzeln. So wurde auf dem Medium BMS mit den Zusatzkomponenten Kinetin, 10^{-7}g/ml + 18% CoM der starke Zuwachs der Keimlinge durch üppige Sekundärwurzelbildung auf Kosten der Kallusentwicklung erreicht.

Dahingegen ist hervorzuheben, daß die hohe Zunahme des Frischgewichts der Keimpflanzen von 14,7 mg auf

395,7 mg auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml allein durch die Kallusbildung erfolgte. Mit diesem Ergebnis ist es gelungen, die Monocotyledonae Dioscorea composita auf einem vollsynthetischen Nährboden zur Bildung eines schnell wachsenden Kallusgewebes zu bringen. Auf diesem Medium konnte an allen Organen des Keimlings Kallus induziert werden und zwar am basalen Teil des Sprosses (Hypocotyl + Vegetationskegel) bei 93%, am Blattstiel bei 40%, an den Wurzeln bei 24% und am Cotyledo bei 10% der Kulturen.

Diosgenin-Gehalt der Keimpflanzen:

Nachdem das Problem der Kallusinduktion auf diese Weise gelöst worden war, mußte überprüft werden, ob die Keimpflanzen von Dioscorea composita unter diesen Versuchsbedingungen (BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml; 28° C, Dauerdunkel) über Diosgenin verfügen bezw. galt es, den Zeitpunkt des Beginns der Diosgenin-Synthese in der Pflanze zu erfassen.

Ebenso mußte die Frage geklärt werden, ob Licht die Voraussetzung für die Diosgenin-Synthese in den Keimlingen ist oder ob es sie fördert. Es mußten also Licht- (12 : 12 stündiger Licht-Dunkel-Wechsel, 2000 Lux) und Dunkelkulturen vergleichend untersucht werden und Frisch- und Trockengewichtszunahme sowie der Diosgenin-Gehalt in wöchentlichen Abständen bestimmt werden. In den in den Tabellen 2 bis 5 aufgeführten Versuchsgruppen sind die Daten für das Frisch- und Trockengewicht aus 20 Einzelmessungen (= Mittelwerte aus zwei Parallel-Ansätzen mit je zehn Keimpflanzen) gewonnen worden. Die Diosgenin-Quantitäten sind Mittelwerte aus zwei Analysen.

Tabellen 2 - 5:

Wachstum und Diosgenin-Gehalt von Dioscorea-Keimpflanzen:

Tabelle 2: Bei Kultur auf BMS bei 28° C im Dunkeln:

Kulturzeit d. Pfl. (Wochen)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ø Frischgew./Pfl. (mg)	11,3	26,0	43,1	58,6	71,1	131,8	120,3	141,0	124,9	131,9	133,9
ø Trockengew./Pfl.(mg)	5,9	7,2	6,7	8,3	8,4	13,7	11,1	15,9	12,2	12,2	12,6
γ Diosgenin/mg Trockengew.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle 3: Bei Kultur auf BMS+2,4-D,10^{-6}g/ml+Kinetin,10^{-6}g/ml bei 28° C im Dunkeln:

ø Frischgew./Pfl. (mg)	11,3	24,4	49,2	77,4	127,9	224,2	226,5	274,2	641,2	739,8	644,3
ø Trockengew./Pfl.(mg)	5,9	6,7	9,0	11,6	16,3	25,3	25,3	28,5	59,1	56,6	52,3
γ Diosgenin/mg Trockengew.	0,0	0,0	0,0	0,027	0,079	0,217	0,132	0,165	0,376	0,141	0,153
γ Diosgenin-Gesamttrockeng.	0,0	0,0	0,0	0,313	1,288	5,490	3,340	4,703	22,222	7,981	8,002

Tabelle 4: Bei Kultur auf BMS bei 28°C im Licht-Dunkel-Wechsel (12/12 Std.):

ø Frischgew./Pfl. (mg)	11,3	25,5	43,9	64,9	59,9	123,9	144,7	175,7	199,5	176,6	277,4
ø Trockengew./Pfl. (mg)	5,9	7,8	8,1	10,2	10,4	16,3	19,9	23,1	24,8	35,1	36,8
γ Diosgenin/mg Trockengew.	0,0	0,0	0,0	0,197	0,145	0,133	0,227	0,179	0,189	0,233	0,321
γ Diosgenin/Gesamttrockeng.	0,0	0,0	0,0	2,009	1,508	2,166	4,517	4,135	4,687	8,179	11,813

Tabelle 5: Bei Kultur auf BMS+2,4-D,10^{-6}g/ml+Kinetin,10^{-6}g/ml bei 28°C im Licht-Dunkel-Wechsel (12/12 Stdn., 2000 Lux):

ø Frischgew./Pfl. (mg)	11,3	25,1	41,8	70,2	109,8	236,9	280,3	284,6	666,3	664,2	727,2
ø Trockengew./Pfl.(mg)	5,9	6,5	7,8	10,9	14,6	29,7	32,1	34,5	67,2	64,8	75,2
γ Diosgenin/mg Trockengew.	0,0	0,0	0,0	0,079	0,245	0,274	0,262	0,293	0,335	0,274	0,265
γ Diosgenin/Gesamttrockeng.	0,0	0,0	0,0	0,861	3,577	8,138	8,410	10,109	22,512	17,755	19,928

Frisch-und Trockengewichts-Bestimmungen:

Mittelwerte aus 20 Einzelmessungen.

Diosgenin-Bestimmungen:

Mittelwerte aus zwei Analysen.

Die Tabelle 2 enthält Ergebnisse der etioliert wachsenden Keimlinge (auf BMS im Dunkeln). In der Tabelle 4 sind die Werte für normalwüchsige Pflanzen dargestellt (auf BMS im Licht/Dunkel) und in den Tabellen 3 und 5 sind die Daten aufgeführt für Keimpflanzen, die unter Wuchsstoffeinfluß stehen und unter diesen Bedingungen Kallus bilden und Adventivwurzeln anlegen (s.die Bilder im Anhang).

a) Diosgenin-Synthese in Dunkelkeimlingen:

Die auf dem Basalmedium gehaltenen Keimpflanzen zeigen nur ein geringes Wachstum und synthetisieren während der zehnwöchigen Kulturdauer kein Diosgenin (s.Tab.2).

Werden dem Nährboden die Wuchsstoffkomponenten 2,4-D und Kinetin in den Konzentrationen von 10^{-6}g/ml hinzugefügt, so werden die Frisch- und Trockengewichtszunahmen etwa um das Sechsfache gesteigert (vgl.Tab.2 mit Tab.3). Die Diosgenin-Synthese beginnt in der dritten Kulturwoche und hält mit der Trockensubstanzvermehrung Schritt (s.Tab.3).

Diese Ergebnisse weisen auf eine Korrelation zwischen Wachstum und Diosgenin-Synthese hin.

b) Diosgenin-Synthese in Lichtkeimlingen:

Sowohl auf dem Basalmedium als auch auf dem durch 2,4-D und Kinetin ergänzten Nährboden synthetisieren die Lichtkeimlinge von der dritten Kulturwoche ab Diosgenin. In beiden Versuchsgruppen wird das Steroid-Sapogenin in etwa der gleichen Größenordnung nachgewiesen:
~0,2 γ bis 0,3 γ Diosgenin/mg Trockengewicht auf BMS und
~0,1 γ bis 0,3 γ Diosgenin/mg Trockengewicht auf BMS + 2,4-D,

10^{-6}g/ml + Kinetin, 10^{-6}g/ml (s.Tab.4 und Tab.5). Die Abweichungen in den Einzelwerten lassen sich statistisch nicht absichern ($P > 0,05$).

Bei den Lichtkeimlingen laufen Diosgenin-Synthese und Trockensubstanzzunahme ebenfalls parallel (s.die Rubriken Trockengew./Pflanze (mg) und Diosgenin/Gesamttrockengew. in Tab.4 und Tab. 5).

Bei vergleichender Betrachtung der Licht- und Dunkelkeimlinge hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Steroidsynthese wird deutlich, daß das Licht die Diosgenin-Synthese fördert (vgl.Tab. 2 mit Tab. 4).

Die fördernde Wirkung des Lichtes kann durch die Komponenten 2,4-D und Kinetin voll ersetzt werden, so daß auch die Dunkelkeimlinge im gleichen Entwicklungsalter (3 Wochen) und in ca. gleicher Menge (~0,1 γ bis 0,2 γ/mg Trockengew. $P > 0,05$) Diosgenin synthetisieren.

Diosgenin-Bestimmung im Kallus:

Im Folgenden wird geprüft, ob die an den verschiedenen Organen der Pflanzen entstandenen Kalli (Hypocotyl-Kallus, Blattstiel-Kallus, Cotyledo-Kallus und Wurzel-Kallus) Diosgenin enthalten. Dazu werden acht Wochen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6}g/ml + Kinetin, 10^{-6}g/ml gezogene Pflanzen aufgearbeitet, indem die Kalli abpräpariert und getrennt analysiert werden.

Tabelle 6: Diosgenin-Gehalt (Mittelwerte aus zwei Bestimmungen) der Dioscorea composita-Kalli verschiedenen Ursprungsgewebes:

Art des Kallus	Diosgenin-Gehalt (γ/mg Trockengew.)
Blattstiel-Kallus	0,03
Cotyledo-Kallus	0,01
Hypocotyl-Kallus	0,07
Wurzel-Kallus	0,05

Durch die in Tabelle 6 aufgeführten Analysenergebnisse wird belegt, daß alle an den verschiedenen Organen der Dioscorea-Pflanze entstandenen Kalli über Diosgenin verfügen. Diese Kallusgewebe erfüllten wegen ihres Diosgenin-Gehaltes die Voraussetzung für eine Weiterkultur.

Wachstum und Diosgenin-Gehalt des isolierten Kallusgewebes:

Die Hypocotyl-Kalli, Blattstiel-Kalli, Cotyledo-Kalli und Wurzel-Kalli wurden explantiert und auf dem ursprünglichen Induktionsmedium BMS + 2,4-D, 10^{-6}g/ml + Kinetin, 10^{-6}g/ml mit vierwöchigen Übertragungszyklen subkultiviert.

Unmittelbar nach der Isolierung von der Pflanze wurden die Kalli, wahrscheinlich durch Polyphenoloxydasen verursachte Braunfärbung, stark dezimiert. Die Ausfälle betrugen nach sechsmonatiger Kultur bei dem

Hypocotyl-Kallus	=	27,7% der Kulturen
Wurzel-Kallus	=	29,4% " "
Sproß-Kallus	=	67,9% " "
Cotyledo-Kallus	=	42,9% " "

Weiterhin mußten stark Wurzeln regenerierende Kalli eliminiert werden, so daß zusätzlich vom

Hypocotyl-Kallus	=	26,6%
Wurzel-Kallus	=	12.5%
Sproß-Kallus	=	27,8%
Cotyledo-Kallus	=	25,0%

der Kulturen ausgeschieden werden mußten. Die Gesamt-Ausfallquote betrug demnach für den

Hypocotyl-Kallus	=	54,5%
Wurzel-Kallus	=	41,8%
Sproß-Kallus	=	95,7%
Cotyledo-Kallus	=	67,9%

Von den verbleibenden Kalli wurden sodann nur die besonders gut wachsenden ausgewählt, so daß es schließlich zehn von 140 Dioscorea-Pflanzen (= 7,1%) waren, deren auf dem Induktionsmedium gebildete Kalli fortdauernd subkultiviert werden konnten.

Auf diese Weise ist es gelungen, Gewebe-Stammkulturen aus der Region des Hypocotyls, des Blattstiels, des Cotyledo und der Wurzeln anzulegen.

Das Verhalten des isolierten Kallus wurde am Beispiel des Hypocotyl-Kallus, der auf dem Induktionsmedium an 93% der behandelten Keimlinge entsteht, hinsichtlich des Wachstums und der Diosgenin-Synthese kontinuierlich untersucht.

Es seien zunächst Wachstum und Diosgenin-Gehalt im 12 : 12 Licht-Dunkel-Wechsel und im Dunkeln kultivierter Kalli vergleichend betrachtet. In den Abbildungen 8a und 8b sind die erzielten Frischgewichtszunahmen wiedergegeben. Die Wägungen wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt, indem in zwei parallelen Ansätzen je 10 Kallusstücke von ca. 100 mg Frischgewicht eingewogen und auf das Kulturmedium gebracht wurden. Die Messungen wurden anfangs in Abständen von zwei Wochen und später alle vier Wochen, gleichzeitig mit der Übertragung auf frischen Nährboden, vorgenommen. Jedes Mal wurden die Kallusgewebe auf 100 mg Frischgewicht zurückgeschnitten, so daß jeder Kurvenpunkt die Frischgewichtszunahme der konstanten Ausgangsgewebemenge (100 mg) im Versuchszeitraum (2 oder 4 Wochen) angibt.

Die in Abb. 8a und 8b dargestellten Wachstumskurven zeigen, daß sich in den ersten vier Kulturmonaten die Zunahme des Frischgewichtes bei den Licht- und Dunkelkulturen nicht unterscheidet. Im fünften Monat ist bei den im

Dunkeln gehaltenen Hypocotyl-Kalli ein sprunghafter Anstieg zu bemerken. Während die Lichtkulturen lediglich eine Verdreifachung des Ausgangsgewichts erreichen, ist bei den Dunkelkulturen innerhalb der 16. bis 20. Kulturwoche bereits das 6,5-fache der eingewogenen Gewebemenge zu messen. Diese Vermehrung um das Sechs- bis Siebenfache innerhalb der vierwöchigen Übertragungszyklen wird über lange Versuchszeiträume hinweg, nämlich noch in zwei Jahre alten Gewebekulturen, erzielt (s.dazu Abb.9).

Ein weiteres Kriterium für eine gut wachsende Gewebekultur ist ihr Zustand. Auch hier fällt ein Vergleich der Licht- und Dunkelkulturen zugunsten der im Dunkeln gehaltenen Gewebe aus: Während die Kalli im Licht äußerst kompakt, hart und fest sind, handelt es sich bei den Dunkelkulturen um weiches, lockeres Gewebe, das sich bei der Übertragung leicht bearbeiten läßt und gut vermehrungsfähig ist.

Für den Zustand der Gewebekulturen ist außer der Konsistenz ebenfalls die Färbung von Bedeutung. Lichtkulturen bilden Chlorophyll und sind deshalb grün, was sich günstig auf die Synthese von Sekundärprodukten auswirken könnte, soweit diese an den Photosynthesemechanismus gekoppelt sind. Diese Vermutung läßt sich für die Dioscorea-Hypocotyl-Kalli hinsichtlich ihres Steroid-Gehaltes jedoch nur bedingt bestätigen. Bei den in Tabelle 7 gegenübergestellten Werten über das Diosgenin-Vorkommen in Licht- und Dunkelkulturen ergibt sich nur für das frisch isolierte Ausgangsmaterial eine schwache Signifikanz ($P = 0,02$). Die übrigen Werte, die bei der Betrachtung der absoluten Zahlen ebenfalls auf einen höheren Steroid-Spiegel der Lichtkulturen schließen lassen, sind statistisch nicht abzusichern ($P = 0,22$ und $P = 0,56$). In diesem Zusammenhang

sei nochmals auf die im Kapitel "Material und Methode" erwähnten Diosgenin-Verluste während des Analysenweges und auf die relativ hohe Fehlergrenze (= 15%), mit denen die Einzelergebnisse behaftet sind, verwiesen.

Tabelle 7: Diosgenin-Gehalt (Mittelwerte aus 2 Bestimmungen der im Licht-Dunkel-Wechsel (12 : 12 Stdn., 2000 Lux) und der im Dunkeln bei 28° C auf dem Medium BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml kultivierten Dioscorea-Hypocotyl-Kalli:

Wochen	Licht-Kulturen Diosgenin γ/mg Trockengew.	Dunkel-Kulturen Diosgenin γ/mg Trockengew.
0	≃ 0,3	≃ 0,1
1	≃ 0,2	≃ 0,2
2	≃ 0,2	≃ 0,2
3	≃ 0,1	≃ 0,1
6	≃ 0,2	≃ 0,1
8	≃ 0,2	≃ 0,1
12	≃ 0,2	≃ 0,1

Die Lichtkulturen zeigen außer Grünfärbung braune bis braunschwarze Teile, die wahrscheinlich durch Polyphenoloxydasen hervorgerufen werden. Gelegentlich schreitet die Braunfärbung innerhalb der vierwöchigen Kulturperiode so stark fort, daß selbst der Nährboden dunkel wird.

Dieser negative Effekt tritt bei den Dunkelkulturen niemals auf. Die im Dunkeln gehaltenen Kalli sind gleichmäßig hell.

Alle erwähnten Befunde führen zu dem Resultat, daß die Kultivierung der Dioscorea-Hypocotyl-Kalli im Dunkeln angebracht ist.

Diese Aussage bezieht sich auf die Kallusinduktion an der Dioscorea-Keimpflanze und auf die Kultur des frisch isolierten Kallus bis zu dem Zeitpunkt, zu dem er seine maximale Wachstumsgeschwindigkeit erreicht hat.

Bringt man Dunkelkulturen mit einer Wachstumsrate von 600% ins Licht, so tritt der für Lichtkulturen geschilderte Hemmeffekt nicht mehr auf: Die Kalli wachsen während der vierwöchigen Beobachtungszeit mit derselben Geschwindigkeit weiter, werden nicht mehr braun, aber sie ergrünen auch nicht.

Die in Abb. 9a, b, c dargestellten Ergebnisse über das Frisch- und Trockengewicht und den Diosgenin-Gehalt, gemessen in monatlichen Abständen bei den jeweiligen Übertragungsperioden (Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen und 2 Analysen), zeigen deutlich, daß Trockensubstanzzunahme, also Wachstum, mit dem Diosgenin-Gehalt der Kulturen korreliert ist.

Um die hier notwendig werdende Unterscheidung zwischen Diosgenin-Gehalt pro Kallus und Diosgenin-Synthese-Leistung pro mg Trockengewicht deutlich hervorzuheben, seien beide Termini, gemessen an frisch isolierten Dioscorea-Hypocotyl-Kalli (Tab.8a) und an länger subkultivierten Kalli (Tab. 8b) gegenübergestellt.

Tabelle 8a und 8b: Untersuchungen des Wachstums (Mittelwerte aus 20 Bestimmungen) und des Diosgenin-Gehaltes (Mittelwerte aus 2 Bestimmungen) in wöchentlichen Abständen an Dioscorea-Hypocotyl-Kalli bei Kultur auf dem Nährboden BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml bei 28°C im Dunkeln:

Tabelle 8a: im frisch isolierten Kallus:

Kulturdauer (Wochen)	Frischgew./ Kultur (mg)	Trockenge./ Kultur(mg)	γDiosgenin/ mgTrockeng.	γDiosgenin/ Kultur
0	100	10	0,099	0,99
1	115	12	0,138	1,66
2	175	17	0,145	2,47
3	220	20	0,125	2,50
4	283	26	0,126	3,28

Tabelle 8b: im längere Zeit subkultivierten Kallus (20 bis 21 Monate alt):

Zeit nach d. Übertragung (Wochen)	Frischgew./ Kultur(mg)	Trockenge./ Kultur(mg)	γDiosgenin/ mgTrockenge.	γDiosgenin/ Kultur
0	100	5	0,112	0,56
1	121	6	0,113	0,68
2	175	7	0,119	0,83
3	468	23	0,104	2,39
4	694	35	0,098	3,43

Die Diosgenin-Synthese-Leistung wird auf eine feste Bezugseinheit, nämlich γ/mg Trockengewicht, berechnet und ist in jungen und älteren Gewebekulturen gleichbleibend hoch ($\sim 0{,}1\ \gamma$). Der Diosgenin-Gehalt bezieht sich auf die gesamte Trockenmasse und gibt somit den Diosgenin-Gehalt der Kultur an. Er steigt mit der Trockensubstanzzunahme.

Die Diosgenin-Synthese-Leistung, die hier für den Hypocotyl-Kallus dargestellt wurde, läßt sich in gleicher

Höhe in Kalli, deren Ursprungsgewebe aus anderen Regionen der Pflanze stammte, nachweisen (s.Tab. 9).

Tabelle 9: Diosgenin (γ/mg Trockengew. = Synthese-Leistung) (Mittelwerte aus 2 Bestimmungen) in Dioscorea-Gewebekulturen verschiedenen Ursprungsgewebes:

Kallus	Diosgenin γ/mg Trockengew.
Blattstiel-Kallus	0,082 ≃ 0,1
Hypocotyl-Kallus	0,131 ≃ 0,1
Cotyledo-Kallus	0,085 ≃ 0,1
Wurzel-Kallus	0,088 ≃ 0,1

Bei dem Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit der aus den verschiedenen Organen stammenden Gewebekulturen zeigt sich, daß die bereits achtzehn Monate auf BMS + 2,4-D, 10^{-6}g/ml + Kinetin, 10^{-6}g/ml im Dunkeln subkultivierten Hypocotyl-, Blattstiel- und Cotyledo-Kalli gleich schnell und gut wachsen. Lediglich die Wurzel-Kalli sind nicht in gleichem Maße vermehrungsfähig, können jedoch dennoch über lange Zeiträume subkultiviert werden. (s.Abb. 11).

Versuche zur Steigerung der Steroidsynthese:

Nachdem es gelungen war, diosgeninhaltige und zur fortdauernden Diosgenin-Synthese befähigte Gewebekulturen von Dioscorea composita anzulegen, galt es, in diesem Material die Diosgenin-Synthese zu steigern und damit die Steroide im Kallus anzureichern.

Durch Zusatz der Steroid-Praecursoren Natrium-Acetat (2×10^{-6} g/ml) und Mevalonsäure (10^{-6} g/Ml) zum Kulturmedium wurde geprüft, ob die Diosgenin-Synthese beeinflußt werden kann und wie sich diese Komponenten auf das Wachstum der Gewebe auswirken.

Die Tab. 10 gibt Auskunft über die Syntheseleistung sechs Monate und achtzehn Monate lang subkultivierter Hypocotyl-, Blattstiel-, Cotyledo- und Wurzel-Kalli, die vier Wochen auf den mit den Steroid-Vorstufen versetzten Nährböden gehalten wurden.

Tabelle 10: Diosgenin-Synthese-Leistung (γ/mg Trockengew.) (Mittelwerte aus 2 Bestimmungen) in Dioscorea composita-Gewebekulturen nach Behandlung mit Steroid-Praecursoren bei Kultur im Dunkeln und 28° C:

	BMS +2,4-D,10^{-6} +Kinetin,10^{-6}	BMS +2,4-D,10^{-6} +Kinetin,10^{-6} +Na-Acetat 2×10^{-6}	BMS +2,4-D,10^{-6} +Kinetin,10^{-6} +Mevalons.10^{-6}
Hypocotyl-Kallus 6 Monate	0,077	0,098	0,042
Hypocotyl-Kallus 18 Monate	0,098	0,176	0,024
Blattstiel-Kallus 18 Monate	0,076	0,129	0,049
Cotyledo-Kallus 18 Monate	0,085	0,131	0,056
Wurzel-Kallus 18 Monate	0,043	0,121	0,045

Die Betrachtung der Tabelle läßt die Schlußfolgerung zu, daß die Mevalonsäure keinen Einfluß auf die Steroid-Synthese nimmt. Schwache Signifikanz mit $P = 0,02$ deutet einen Abfall der Synthese-Leistung im achtzehn Monate alten Hypocotyl-Kallus nach Mevalonsäure-Zusatz an. Die nach Acetat-Einwirkung erhöhten Diosgenin-Werte lassen sich gegen die Kontrolle statistisch nicht absichern. Nur für den achtzehn Monate alten Hypocotyl-Kallus ergibt sich eine schwache Signifikanz mit $P = 0,02$. Für alle anderen Werte wird $P > 0,05$.

Einflüsse auf das Wachstum sind nach Acetat- und Mevalonsäure-Zusatz mit Hilfe des dreifachen mittleren Fehlers nicht abzusichern; die in Abb. 12 eingetragenen dreifachen mittleren Fehler überschneiden sich.

II. Solanum laciniatum Ait. (Syn. aviculare Forst.)

Für die Versuche mit Solanum laciniatum Ait. lieferten unter sterilen Bedingungen aus Samen herangezogene Pflanzen das Untersuchungsmaterial (über die sterile Anzucht s. im Kapitel "Material und Methode").

1. Wahl des Versuchsmaterials mit Berücksichtigung des Solasodin-Gehaltes:

Solasodin, ein Produkt des Sekundärstoffwechsels, konnte in den Samen von Solanum laciniatum Ait. nicht nachgewiesen werden.

Es galt, den Zeitpunkt des Beginns der Solasodin-Synthese und den Bildungsort aufzufinden. Zu diesem Zweck wurden die steril angezogenen Solanum-Pflanzen im Alter von ein bis sechs Wochen analysiert, wobei die verschiedenen Organe getrennt aufgearbeitet wurden.

1a) Entwicklungszustand der Keimpflanzen:

Eine Woche alte Solanum-Keimlinge haben die Cotyledonen entfaltet, aber noch keine Folgeblätter entwickelt.

Nach vierzehn Tagen haben die Pflanzen die Primärblätter ausgebildet, so daß sie zusätzlich zu den anderen Organen (Vegetationskegel, Cotyledonen und Wurzeln) auf ihren Solasodin-Gehalt untersucht werden können.

Im Alter von drei Wochen sind die Cotyledonen abgeworfen worden oder doch bereits so stark vergilbt, daß sie als Untersuchungsmaterial nicht mehr geeignet sind. Außer den beiden Primärblättern sind meist zwei Sekundärblätter entwickelt. Durchschnittlich werden drei bis vier Blätter

pro Pflanze gezählt, die mit dem Stiel abpräpariert und analysiert werden.

In den folgenden vier bis sechs Wochen steigt die Zahl der Sekundärblätter auf vier bis sechs pro Pflanze. Von fünf Wochen alten Pflanzen haben 25% die Primärblätter abgeworfen. Bei weiteren 25% sind die Primärblätter vergilbt. Diese Versuchsgruppe schied deshalb nach der fünften Kulturwoche aus.

1b) Solasodin-Gehalt der Keimpflanzen:

Die Tabelle 11 gibt Auskunft über den Solasodin-Gehalt der verschiedenen Organe der Solanum-Pflanzen in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand:

Tabelle 11: Solasodin-Gehalt (γ/mg Trockengewicht) (Mittelwerte aus 2 Bestimmungen):

Organ	Wurzel	Hypocotyl	Cotyledonen	Primär-Blätter	Sekundär-Blätter	Vegetationskegel
1 Woche	0,000	0,82	0,000	---	---	1,22
2 Wochen	0,007	2,32	0,006	0,79	---	0,005
3 Wochen	0,007	1,22	---	0,96	1,96	1,06
4 Wochen	Spur	1,11	---	0,36	1,87	Spur
5 Wochen	Spur	2,84	---	0,63	3,02	0,000
6 Wochen	0,000	4,75	---	---	2,80	0,000

Die in der Tabelle 11 aufgeführten Solasodin-Werte erlauben keine Rückschlüsse auf den Solasodin-Synthese-Ort, geben jedoch eindeutige Auskunft über das Solasodin-Vorkommen.

Während das Alkaloid in den Wurzeln höchstens in Spuren nachzuweisen ist, ist es im Sproß in reichlichem Maße vorhanden, und sein Gehalt steigt mit zunehmendem Alter an.

Auf Grund dieser Ergebnisse dienten das Hypocotyl und die Sekundär-Blätter sechs Wochen alter Solanum laciniatum-Pflanzen als Ausgangsmaterial für den größten Teil der Versuche.

2. Kallusinduktion und Förderung des Kalluswachstums durch geeignete Wachstumskomponenten:

Vorversuche zeigten bereits, daß intakte Solanum-Pflanzen auf dem Basalmedium zu 20% spontan Kallus bildeten. Diese Kalli traten immer am basalen Teil des Hypocotyls an der Grenze zwischen Hypocotyl und Wurzel auf.

Andererseits waren isolierte Organe befähigt, Wurzeln oder Sprosse und Wurzeln zu regenerieren und so zum Teil zu ganzen Pflanzen heranzuwachsen (s.Tab.12).

Tabelle 12: Regenerationsvermögen isolierter Solanum-Organe auf dem Basalmedium (BMS); (% der Explantate mit Regeneraten):

Explantat / Regenerat	Vegetationskegel	Hypocotyl	Cotyledonen	Wurzeln
Wurzeln	100%	75%	75%	100%
Sprosse	100%	0	0	0

Die nachfolgenden Versuche wurden unternommen, um einen homogen wachsenden, solasodin-haltigen Kallus zu

bekommen. Dabei mußte beachtet werden, daß die Tendenz zum Regenerieren unterdrückt und die Möglichkeit vom differenzierten Zustand in den dedifferenzierten umzuschlagen, durch geeignete Komponenten gefördert wurde.

Bekanntlich lassen sich beide Prozesse durch Auxin-Einwirkung konzentrationsabhängig steuern (FELLENBERG, 1963; ALLSOPP, 1964; RAGHAVON u.TORREY, 1964), was auch die durchgeführten Versuche bestätigen (s.u. und dazu Tab.13a und 13b und die Abb. 15a, b).

Vorerst galt es jedoch, die für die Kallusinduktion und das Kalluswachstum günstigsten Standardbedingungen zu erfassen.

Die für die Anzucht des Pflanzenmaterials gewählten Außenfaktoren (28° C und 2000 Lux im 12 : 12 Stdn.-Licht-Dunkel-Wechsel) blieben in allen weiteren Versuchen unverändert.

Überprüft wurden die drei von WHITE, 1943 (BMW), HELLER, 1953 (BMH) und von MURASHIGE und SKOOG, 1962 (BMS) entwickelten Basalmedien in ihrer Wirkung auf das Wachstum, gemessen an der Frisch- und Trockengewichtszunahme (s. Abb. 13a, b, c, d).

Die Abb. 13 zeigen, daß das BMS, verglichen mit den beiden anderen getesteten Nährböden, die besten Voraussetzungen für das Wachstum bietet.

Ein weiterer Vorversuch diente der Klärung der Frage nach dem günstigsten pH-Bereich des Nährmediums (s.Abb.14). In der Testserie, die die pH-Werte 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 und 8,0 erfaßte, zeigte sich, daß das Wachstum weitgehend pH-unabhängig ist: Die Kulturen wachsen bei allen pH-Stufen gleich gut; nur bei höherer Acidität (pH 5,0) tritt eine Hemmung auf. In den anschließend durchgeführten Experimenten wurden die Nährlösungen vor

dem Autoklavieren auf pH = 5,8 eingestellt. Das entspricht dem allgemein in der Literatur für die Kultur verschiedener anderer Objekte angeführten Wert.

Nach Ermittlung der Standardbedingungen konnten sowohl die Versuche zur Unterdrückung des Regenerationsvermögens, als auch die Ansätze zur Induktion und Förderung des Kalluswachstums durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde das Basalmedium (BMS) durch Auxin (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) in den Konzentraten von 10^{-7}, 10^{-6} und 10^{-5} g/ml und durch andere Komponenten (Cocosnußmilch, Hefeextrakt und Kinetin) modifiziert.

Bereits allein das Auxin ist in der Lage, beide Forderungen zu erfüllen. Aus den folgenden Tabellen, in denen das Auftreten der ersten Regeneratwurzeln an Hypocotyl-Explantaten von Solanum laciniatum Ait. dargestellt wird, geht deutlich hervor, daß die Unterdrückung differenzierten Wachstums durch Axin konzentrationsabhängig ist (s.Tab.13a). Bei erhöhter Auxingabe erfolgt eine absolute Hemmung des Regenerationsvermögens.

Tabelle 13a: Auftreten der ersten Regeneratwurzeln am Solanum-Hypocotyl-Explantat am X.Versuchstag:

2,4-D-Konz. (g/ml)	Hypocotyle mit Regeneratwurzeln	Versuchstag
10^{-7}	25%	8.
10^{-6}	5%	12.
10^{-5}	0	-

Tabelle 13b: Maximale Regenerationsleistung der Solanum-Hypocotyl-Explantate während vierwöchiger Versuchsdauer in Abhängigkeit von der 2,4-D-Konz.:

2,4-D-Kons. (g/ml)	Hypocotyle mit Regeneratwurzeln	Versuchstag
10^{-7}	85%	30.
10^{-6}	40%	22.
10^{-5}	0	-

Kallusbildung ist auf 2,4-D, 10^{-7} g/ml nur an den bewurzelten Explantaten zu beobachten und steigt, wie die Wurzelregeneration, ebenfalls von 25% am achten Versuchstag auf 85% am Ende der Kulturperiode.

Auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml steigt die Kallusbildung auf 100% und die Wurzelregeneration auf 40%, während auf BMS + 2,4-D, 10^{-5} g/ml sowohl Regenerationen als auch Kallusbildung völlig unterbleiben.

Die Hypocotyl-Explantate sind allein durch Auxin nicht zur Kallusbildung anzuregen, wenn gleichzeitig völlige Unterdrückung des Regenerationsvermögens angestrebt wird. Es gilt also, andere Komponenten zur Kallusinduktion zu finden.

Nach Zusatz von 0,025% Hefeextrakt wird eine Verminderung der Organbildung an den Explantaten des Hypocotyls bewirkt. Jedoch zeigt sich auch hier eine Abhängigkeit der Regeneratbildung von der Auxin-Konzentration in gleicher Weise wie ohne Hefeextraktgabe (s.Tab. 14).

Tabelle 14: Auftreten der ersten Regeneratwurzeln am isolierten Hypocotyl am X. Versuchstag nach Zusatz von 0,025% Hefeextrakt zum auxinhaltigen Medium:

2,4-D-Konz. (g/ml)	Hypocotyle mit Regeneratwurzeln	Versuchstag
10^{-7}	30%	7.
10^{-6}	13%	7.
10^{-5}	0	-

Mit 30% Regeneratwurzeln nach Einwirkung von 0,025% Hefe + 2,4-D, 10^{-7}g/ml und 13% Wurzeln bei Hefeextrakt + 2,4-D, 10^{-6}g/ml am 7. Versuchstag ist zugleich die maximale Regenerationsleistung erreicht.

Die bei 2,4-D, 10^{-6}g/ml auftretenden Regeneratwurzeln (sowohl bei 2,4-D allein, als auch in Kombination mit Hefeextrakt) sind verdickt, kurz und zapfenförmig und werden gegen Ende der Versuchszeit vom wachsenden Kallus überwuchert.

Zusätze von Hefeextrakt zum auxinhaltigen Medium führen zwar zu einer größeren Frisch- und Trockengewichtszunahme (vgl.Abb. 15 mit Abb. 16), jedoch sind die Kallusinduktion und -entwicklung nicht sonderlich gefördert. Auf BMS + 2,4-D, 10^{-7}g/ml + 0,025% Hefe setzt die Kallusbildung erst nach drei Wochen ein und tritt nur an 35% der behandelten Kulturen auf. Die Kalli sind zudem größtenteils braun. Die Kulturen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6}g/ml + 0,025% Hefe bleiben hell, haben insgesamt zu 50% Kallus entwickelt, wovon 25% gut wuchsen und die übrigen 25% etwas im Wachstum zurückblieben. Nach Einwirkung von 2,4-D, 10^{-5}g/ml + 0,025% Hefe sind weder Differenzierung

noch Kallusbildung zu beobachten, Es wird lediglich eine geringe Frischgewichtszunahme gemessen.

Aus den Ergebnissen der beiden Versuchsgruppen, Auxin-Einfluß allein und Auxin in Kombination mit Hefeextrakt, geht deutlich hervor, daß die 2,4-D-Konzentration von 10^{-6}g/ml sowohl für die Herabsetzung der Regenerationsleistung als auch für die Induktion der Kallusbildung am günstigsten ist. Es gilt allerdings, den Hefeextrakt durch eine geeignetere, auf das Kalluswachstum fördernd wirkende Komponente zu ersetzen.

Zu diesem Zweck diente Cocosnußmilch in den Konzentrationen von 5%, 10%, 15% und 18% als Zusatz zu dem Basalmedium (BMS) mit der ausgewählten konstanten 2,4-D-Konzentration von 10^{-6}g/ml. Auf dem cocosnußmilchhaltigen Nährboden aller Konzentrationsstufen reagieren die isolierten Organe zu 100% mit Kallusinduktion und sehr starkem Kalluswachstum (s.Abb. 17a, 17b). Differenzierungen treten am explantierten Hypocotyl nicht auf.

Ein Vergleich der Abb. 15 und 16 mit der Abb. 17 zeigt deutlich die beträchtliche Kalluszunahme nach CoM-Einfluß. Dabei handelt es sich um helle, schnell wachsende und damit gut vermehrungsfähige Kalli. Damit wären die Voraussetzungen für die Anzucht einer gut wachsenden Gewebekultur gefunden. Da jedoch die Zusammensetzung der Cocosnußmilch nicht vollständig aufgeklärt ist, wird versucht, die CoM durch andere Komponenten zu ersetzen, um möglichst zu einem vollsynthetischen, definierten Kulturmedium zu gelangen. In der folgenden Versuchsreihe wurde an Stelle von Cocosnußmilch Kinetin dem Nährboden zugefügt (s.Abb. 18a, b, c, d und Tab. 15a, 15b).

Tabelle 15a: Regeneration der isolierten Solanum-Blätter nach Einfluß von 2,4-D, 10^{-6} g/ml, Kinetin, 10^{-6} g/ml und der Kombination von 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml

% Blätter mit Regeneraten	BMS +2,4-D, 10^{-6}	BMS + Kin., 10^{-6}	BMS + 2,4-D, 10^{-6} + Kin., 10^{-6}
% Sprosse	0,0	100	0,0
% Wurzeln	40	0,0	20
% Wurzeln und % Sprosse	0,0	0,0	0,0
Kallus	100	100	100

Tabelle 15b: Regeneration der isolierten Solanum-Hypocotyle nach Einfluß von 2,4-D, 10^{-6} g/ml, Kinetin, 10^{-6} g/ml und der Kombination von 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml

% Hypocotyle mit Regeneraten	BMS +2,4-D, 10^{-6}	BMS +Kin, 10^{-6}	BMS +2,4-D, 10^{-6} + Kin., 10^{-6}	Kontrolle
% Sprosse	0,0	60	0,0	0,0
% Wurzeln	80	0,0	40	75
% Wurzeln und % Sprosse	0,0	40	0,0	0,0
Kallus	100	80	100	20

In den Tabellen 15a und 15b tritt die Wirkung der 2,4-D auf die Wurzelregeneration wiederum in Erscheinung.

Die aus der Literatur hinreichend bekannte Wirkung des Kinetin auf die Sproßbildung (SKOOG und MILLER, 1957; SCHRAUDOLF und REINERT, 1959; MURASHIGE, 1961, 1964; TOPONI, 1963) wird hier ebenfalls deutlich. An isolierten Blättern und isolierten Hypocotylen werden zu 100% Sproßregenerate induziert. Das Kinetin vermag die Fähigkeit zur Wurzelregeneration an Hypocotyl-Explantaten zu vermindern und an isolierten Blättern völlig zu unterdrücken.

Kallusbildung wird zwar an 100% der Kulturen oder doch zumindest an 80% nach Auxin- oder Kinetin-Behandlung erreicht, wenn die Wirkstoffe getrennt verabfolgt werden. Das Kalluswachstum jedoch wird sehr viel üppiger, wenn den Kulturen beide Komponenten gleichzeitig zur Verfügung stehen (s.Abb. 18a, b, c, d). Im Hinblick auf das Wachstum (Frisch- und Trockengewichtszunahme) wirken Auxin und Kinetin nahezu additiv. Die Regenerationsleistungen werden antagonistisch beeinflußt: Das Auxin hemmt die kinetininduzierte Sproßbildung völlig, und das Kinetin kann die unter Auxin-Einfluß erhalten gebliebene Fähigkeit zur Wurzelregeneration auf die Hälfte herabsetzen.

Die nach dem fünften Versuchstag aus den Explantaten austretenden Regeneratwurzeln werden gegen Ende der vierwöchigen Kulturzeit auf dem Medium BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml nahezu vollständig von dem üppig wachsenden Kallus überwuchert. Durch Selektion dedifferenzierten Gewebes bei der Übertragung auf frischen Nährboden wird für die Subkultur homogen wachsendes Gewebe erhalten, dessen Wachstumsgeschwindigkeit über lange Versuchszeiträume gleichbleibend hoch ist.

Ein Vergleich zwischen der Cocosnußmilch und dem Kinetin in ihrer Wirkung auf das Wachstum (s.Abb.19a,19b) der Gewebe zeigt deutlich, daß das Kinetin die Cocosnußmilch vollwertig ersetzt.

3. Solasodin-Gehalt der Solanum-Blatt- und Hypocotyl-Kalli:

Solasodin-Analysen ergaben eine enorme Verminderung des Steroid-Gehaltes bereits unmittelbar nach der Isolierung des Pflanzenmaterials (s.Tab. 16a und 16b). Dabei ist auffällig, daß der Abfall im Hypocotyl stärker ist als in den Blättern: Im Hypocotyl sinkt der Solasodin-Gehalt von 4,2 γ Solasodin/mg Trockengewicht bereits einen Tag nach der Isolierung auf 1,05 γ bezogen auf das Trockengewicht. Nach längerer Kulturdauer wird der Solasodin-Gehalt weiterhin vermindert. Im explantierten Hypocotyl ist in der vierten Kulturwoche kein Solasodin mehr nachzuweisen, und in den Blättern ist es in der fünften Woche nach der Isolierung völlig verschwunden.

Der Steroid-Abfall, der schließlich zum totalen Solasodin-Verlust führt, muß im Zusammenhang mit der fortschreitenden Dedifferenzierung gesehen werden. Die Umgestaltung des differenzierten Gewebes beginnt makroskopisch sichtbar am fünften Versuchstag. Der Kallus entsteht zuerst an den Schnittstellen als Wundkallus; beim Blatt folglich am Blattstiel und häufig auch an den Stellen der Blattspreite, die mit dem Medium Kontakt haben; beim Hypocotyl am basalen und apikalen Ende ohne Bevorzugung eines der beiden Pole. Der Kallus wächst rapide (s.Abb. 19), so daß schließlich das gesamte Hypocotyl überwuchert wird. In der fünften Kulturwoche ist das Ursprungsgewebe des Hypocotyls vollständig dedifferenziert. Am Blattexplantat wächst der entstandene Kallus ebenfalls gut weiter, allerdings nicht ganz so schnell wie der Hypocotyl-Kallus. Der anfangs am Blattstiel gebildete Kallus überwächst die Blattbasis und schließlich die gesamte Blattspreite,

jedoch ist in der fünften Kulturwoche noch Ursprungsgewebe vorhanden.

Die in den Tabellen 16a und 16b aufgeführten Analysenergebnisse dokumentieren den Solasodin-Gehalt der isolierten Sekundär-Blätter, respektive des Hypocotyls innerhalb der ersten Kulturwoche, gemessen in täglichen Abständen. Da auf dem Medium BMS + 2,4 D, 10^{-6}g/ml + Kinetin, 10^{-6}g/ml Kallus erst am 5. Tage nach der Isolierung an den Explantaten sichtbar wird, geben die Werte den Solasodin-Gehalt im organisierten Ursprungsgewebe an.

Tabelle 16a: Wachstum und Solasodin-Gehalt der Solanum-Hypocotyl-Explantate bis zum 6. Tage nach der Isolierung:

Kulturdauer (Tage)	0	1	2	3	4	5	6
⌀ Frischgew./ Hyp.(mg)	20,00	10,30	15,40	17,50	19,50	28,30	29,30
⌀ Trockengew./ Hyp. (mg)	2,00	0,80	0,90	1,00	1,10	1,80	1,80
% Solasodin/mg Trockengew.	4,75	1,05	0,90	0,42	0,56	0,69	0,44

Tabelle 16b: Wachstum und Solasodin-Gehalt der Solanum-Blatt-Explantate bis zum 6. Tage nach der Isolierung:

Kulturdauer (Tage)	0	1	2	3	4	5	6
⌀ Frischgew./ Blatt (mg)	10,00	10,50	10,70	13,50	13,50	20,80	17,10
⌀ Trockengew./ Blatt (mg)	1,00	1,00	1,10	1,40	1,40	2,40	1,90
% Solasodin/mg Trockengew.	2,78	1,20	1,70	0,44	0,90	1,65	2,06

In den Tabellen 17a und 17b ist der Steroid-Gehalt, gemessen in wöchentlichen Abständen, bis zur 6. Kulturwoche dargestellt worden.

Tabelle 17a: Wachstum und Solasodin-Gehalt der Solanum-Hypocotyl-Explantate bis zur 6. Woche nach der Isolierung:

Kulturdauer (Wochen)	0	1	2	3	4	5	6
⌀Frischgew./ Hyp.(mg)	20,00	34,10	104,3	133,5	1476,9	1492,1	2167,1
⌀Trockengew./ Hyp.(mg)	2,00	2,30	7,2	11,1	97,7	90,9	157,3
γSolasodin/mg Trockengew.	4,75	0,62	0,20	0,13	0,13	0,00	0,00

Tabelle 17b: Wachstum und Solasodin-Gehalt der Solanum-Blatt-Explantate bis zur 6. Woche nach der Isolierung:

Kulturdauer (Wochen)	0	1	2	3	4	5	6
⌀Frischgew./ Blatt (mg)	10,00	29,60	70,30	172,7	553,2	896,1	1710,1
⌀Trockengew./ Blatt (mg)	1,00	3,60	7,90	17,7	46,1	78,9	87,0
γSolasodin/mg Trockengew.	2,78	0,55	0,95	0,07	0,0	0,0	0,0

In den Analysen sind die Explantate zusammen mit dem an ihnen entstandenen Kallus aufgearbeitet worden.
Zu beachten ist,

daß mit fortschreitendem Kalluswachstum der Solasodin-Gehalt, bezogen auf das Trockengewicht, sinkt. In diesem Zusammenhang ist die anfangs in der Einleitung gestellte Frage zu klären, ob und wieweit dedifferenziertes Gewebe zu Syntheseleistungen befähigt ist. Die Beantwortung dieser Frage liefert eine getrennte Analyse des explantierten Blattes und des Blattkallus: Werden Ursprungsgewebe und Blattkallus nach vierwöchiger Kultur auf dem Nährboden BMS + 2,4-D, 10^{-6}g/ml + Kinetin, 10^{-6}g/ml voneinander getrennt, so lassen sich in den Blättern 0,90 γ Solasodin/mg Trockengewicht nachweisen, während im Kallus das Solasodin nicht zu erfassen ist. Selbst im organisierten Gewebe des Blattexplantates ist vier Wochen nach der Abtrennung von der Pflanze der Solasodin-Spiegel von anfangs 2,78 γ auf 0,90 γ, bezogen auf das Trockengewicht, gesunken.

Paralleluntersuchungen am Hypocotyl-Explantat lassen sich nicht durchführen, da organisiertes Gewebe und Kallus nicht voneinander getrennt werden können, da das gesamte Ursprungsgewebe zu Kallus umgebildet worden ist (s. Bilder im Anhang).

Durch Zugabe der Vorstufen der Steroid-Synthese Natriumacetat (2 x 10^{-6}g/ml) und Mevalonsäure (10^{-6}g/ml) zum Kulturmedium wurde versucht, die Solasodin-Produktion im steroidfreien Kallus anzuregen. Nach vierwöchiger Einwirkung dieser Praecursoren auf die Gewebe erbrachten die Analysen negative Resultate. Auch auf das Wachstum haben die zugefügten Stoffe keinen Einfluß (s.Abb.20).

Diskussion:

Die Bemühungen der vorliegenden Arbeit galten der Anlage zur Steroid-Synthese befähigter Gewebekulturen, wobei das Hauptgewicht auf die Experimente mit der monocotyledonen Dioscorea composita Hemsl. gelegt wurde.

Bereits in der Einleitung wurde auf die Schwierigkeiten hingwiesen, die den bisherigen Versuchen, Monocotyledonen in Gewebekultur zu nehmen, entgegenstanden und die nur bei einer geringen Anzahl von Objekten überwunden werden konnten, daß aber die wenigen Pflanzen, bei denen die Anlage der Gewebekultur gelang, bis auf den über das Kinin Zeatin verfügenden Mais (Zea Mays) (LETHAM, SHANNON, Mc DONALD, 1964) auf Zusatz von Cocosnußmilch zum Nährmedium angewiesen sind. Bekanntlich sind in der Cocosnußmilch Kinine enthalten (SHANTZ u.STEWARD, 1952, 1955). Folglich ist es sinnvoll, die Cocosnußmilch durch das synthetische Kinin Kinetin zu ersetzen. Denn offenbar sind auch in der Cocosnußmilch die Kinine die wirksamsten Substanzen, hinter denen die Bedeutung der übrigen Komponenten, der diversen Aminosäuren, zurückbleibt. So erwiesen sich sämtliche geprüfte Aminosäuren in Untersuchungen der Nährstoffansprüche der gymnospermen Picea glauca als praktisch bedeutungslos (RISSER u. WHITE, 1964). Das kann durch diese Untersuchungen bestätigt werden, denn Zusatz des Aminosäuren-Gemisches nach TORREY u. REINERT (1961) zum Nährmedium blieben ohne Einfluß auf das Wachstum der Kulturen.

Für das Kinetin sind aus der Literatur neben der sproßfördernden Wirkung (SKOOG u. MILLER, 1957; SCHRAUDOLF u. REINERT, 1959; MURASHIGE, 1961, 1965; TOPONI, 1963), die hier nicht bei der Dioscoreaceae, wohl

aber bei der Solanaceae auftrat, Effekte auf die Proteinsynthese (DAS, PÄTAU u.SKOOG, 1956; MOTHES, 1960; ENGELBRECHT, 1961; ENGELBRECHT u. MOTHES, 1961, 1964) und auf das Teilungswachstum und die DNS-Synthese (PÄTAU, DAS u. SKOOG, 1957) bekannt. Wegen der zellteilungsfördernden Wirkung ist das Kinetin als Zusatzkomponente zum Nährboden für Gewebekulturen besonders geeignet.

Der Wahl eines geeigneten Mediums für die Induktion der Kallusbildung an Dioscorea composita galt der umfangreichste Teil der Versuche. Es wurde auf der Grundlage des von MURASHIGE u. SKOOG (1962) entwickelten Basalmediums, ergänzt durch die Wirkstoffe 2,4-D und Kinetin (je 10^{-6} g/ml) gefunden. Dieser Nährboden hat außer der fördernden Wirkung auf das Kalluswachstum noch den Vorteil, daß er vollsynthetisch und damit vollständig definiert ist.

Außerdem wurde untersucht, welche Teile der Pflanze am leichtesten Kallus bilden. Für Dioscorea composita erwies sich, daß nicht die Explantate, wie sonst allgemein von anderen pflanzlichen Objekten her bekannt, zur Induktion der Kallusbildung das günstigste Ausgangsmaterial sind, sondern die intakten Keimpflanzen, wenn ihnen die entsprechende Wuchsstoff-Kombination und -Konzentration geboten wurden. Mit diesem Befund kann gleichzeitig die Auffassung gestützt werden, daß für die Auslösung erneuter Zellteilungen nicht immer nur eine mechanische Verletzung die Ursache sein muß, sondern daß auch Störungen auf der physiologisch-chemischen Ebene Kallusbildung bewirken (BÜNNING, 1953, S.131).

Mit dem Übergang zu kallösem Wachstum nehmen die pflanzlichen Zellen ihren embryonalen Zustand erneut wieder an. Damit tritt die Frage auf, ob nach der morphogenetischen Dedifferenzierung die biochemische Differen-

zierung erhalten bleibt, ob also die embryonale Kalluszelle zur Synthese von Sekundärprodukten befähigt ist. Hierzu sind bisher Versuche mit gegensätzlichen Resultaten publiziert worden: WEST u. MIKA (1957) konnten Atropin in Wurzelkalluskulturen nachweisen und SPEAK u. Mitarbeiter (1964) sowie BENVENISTE, HIRTH u. OURISSON (1966) fanden in Tabakgewebekulturen sowohl Alkaloide als auch Steroide.

Dahingegen berichtete PAUPARDIN (1964) über das völlige Verschwinden eines sekundären Pflanzenstoffes bei in vitro-Kultur von Parthenocissus quinquefolia.

Aus diesem unterschiedlichen Verhalten verschiedener pflanzlicher Gewebe bei der Kultur in vitro wird deutlich, daß sich keine allgemein-gültige Aussage über die Fähigkeit zur Synthese von Sekundärprodukten treffen läßt. Vielmehr erhellt daraus die zwingende Notwendigkeit, jeweils das betreffende Objekt einzeln durchzuuntersuchen, besonders, wenn darüber entschieden werden soll, ob es für die Praxis als Lieferant von sekundären Pflanzenstoffen genutzt werden kann.

Gewebekulturen von Dioscorea composita können, wie hier in der Arbeit nachgewiesen worden ist, das Steroid-Sapogenin Diosgenin synthetisieren. Dagegen nimmt der Gehalt des Steroid-Alkaloids Solasodin in Solanum-Explantaten unmittelbar nach der Isolierung rapide ab und ist dann im Kallus unter der Grenze der Nachweisbarkeit. Ob es eventuell in geringen Mengen vorhanden ist, ist nicht völlig ausgeschlossen.

Eine allgemeine Regel über das Vorkommen der Alkaloide kann nicht aufgestellt werden. Gerade für den Alkaloid-Gehalt ergeben sich bereits in intakten Pflanzen die unterschiedlichsten Verhältnisse: Untersuchungen von

NEUBAUER (1964) über den Codein-Gehalt bei Papaver somniferum zeigten sowohl quantitative als auch qualitative Veränderungen im Alkaloidgehalt dieser Pflanze. Bei Catharanthus roseus beobachteten MOTHES, RICHTER, STOLLE und GRÖGER (1965) ebenfalls starke Schwankungen im Alkaloid-Gehalt und im Alkaloid-Vorkommen in den einzelnen Organen während der Entwicklung der Pflanze. Das bemerkenswerteste Ergebnis dieser Arbeitsgruppe ist die Beobachtung, daß bei Catharanthus eine achtwöchige Synthesepause eintrat, worauf anschließend wieder ein Aufbau von Alkaloiden begann, jedoch mit gänzlich anderer Verteilung. Über den völligen Abbau von Hordenin im Sproß von Panicum miliaceum berichteten BRADY und TYLER (1958).

Die Beobachtungen der genannten Autoren mögen zu Erklärungen der hier vorliegenden Ergebnisse herangezogen werden. Auch bei Solanum könnte eventuell eine Synthesepause, die zum Zeitpunkt der Explantation (also bei sechs Wochen alten Pflanzen) einsetzt, die Ursache für den Schwund des Solasodin sein. Ebenso wäre es nach Vermutungen von NEUMANN und TSCHÖPPE (1966) möglich, daß ein Abbau und Umbau des Alkaloids zu Verbindungen führt, die keinen Alkaloidcharakter mehr besitzen, so daß es in der veränderten Form mit Hilfe des hier angewandten Analysen-Aufschlusses nicht zu erfassen ist. Auch könnte es sein,daß die Synthese-Geschwindigkeit nicht mit der durch Wuchsstoffe gesteigerten Wachstumsrate Schritt hält, so daß es dadurch zu einer sukzessiven Verdünnung des Solasodin-Gehaltes in den Solanum-Gewebekulturen kommt.

Die Möglichkeit, daß Alkaloide von der Pflanze an das Nährmedium abgegeben werden, konnten TOZKO und Mitarbeiter (1960) in Untersuchungen an Lupinus angustifolius beweisen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eventuell an den Nährboden abgegebenes Solasodin zu

erfassen. Jedoch war die Analyse des Substrates nicht möglich, weil es beim Einengen wegen des hohen Zuckergehaltes karamelisierte.

Alle zitierten Beobachtungen sind an intakten Pflanzen gewonnen worden. Auch über den Alkaloidgehalt in Gewebekulturen liegen aus jüngster Zeit Ergebnisse vor: 1965 wiesen RICHTER, STOLLE, GRÖGER u. MOTHES in Gewebekulturen von Catharanthus roseus nach sechs Monaten im getrockneten Blattkallus 0,03‰ und im Stengel-Kallus 0,002‰ Vindolin nach; ebenso Vindolinin 0,06‰ im Blattkallus und 0,003‰ im Stengel-Kallus. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren, daß die Gewebekulturen prinzipiell zur Alkaloidsynthese befähigt seien.

Solch geringe Alkaloidmenge, wie im zitierten Fall, läßt sich jedoch bei Solanum aus methodischen Gründen nicht nachweisen. Bei Vindolin und Vindolinin handelt es sich um Alkaloide des Tryptophan-Typs, und ihr Nachweis läßt sich auf das völlig anders gebaute Solasodin (Steroid-Alkaloid) nicht anwenden.

Ein weiterer Nachweis von Alkaloiden in Gewebekulturen gelang NÊTIEN u.COMBET (1966) in Kalli aus Stengelstücken von Datura Methel L. Diese Autoren fanden jedoch, daß der Scopolamin-Gehalt der Gewebekulturen im Vergleich zur intakten Pflanze stark vermindert ist.

Die zitierten Beispiele liefern Parallelen und Erklärungsmöglichkeiten zu den in der vorliegenden Arbeit an Solanum laciniatum gefundenen Ergebnissen. Wenn die Verhältnisse hinsichtlich des Alkaloidgehaltes bereits in der intakten Pflanze derart indifferent sind, daß sie zur erheblichen Herabsetzung des Alkaloidgehaltes oder gar zum totalen Verlust der Synthese-Fähigkeit führen, wird ein ähnliches Verhalten der Gewebekultur verständlich

oder ist zumindest von vornherein nicht ganz auszuschließen.

Den an dem Solanum-Gewebekulturen gewonnenen Resultaten, die einen Verlust der Solasodin-Synthese aufzeigten, stehen die positiven Ergebnisse bei Dioscorea gegenüber. In den Gewebekulturen von Dioscorea composita ist die Synthese-Leistung über lange Versuchszeiträume gleichbleibend hoch. Aber offenbar fehlt den Kalluszellen die Fähigkeit, die Produkte des Sekundärstoffwechsels zu speichern, sonst müßte es zu einer Anreicherung von Diosgenin im Kallus kommen. Das Sapogenin wird normalerweise in den Knollen der Pflanzen gespeichert. Jedoch nur in älteren Knollen erfolgt ein Anstieg des Steroids und sehr wahrscheinlich in nennenswerter Menge erst, wenn sie älter als zwei Jahre sind (PRESTONjr., HAUN, GARVIN u.DAUM,1964). Die hier untersuchten Gewebekulturen standen insgesamt zwei Jahre unter Beobachtung. Es ist nicht ganz auszuschließen, daß in den Kalli, ähnlich wie in den Knollen intakter Pflanzen, zu einem späteren Zeitpunkt die Steroide angereichert werden.

Der in den vorliegenden Untersuchungen für Gewebekulturen gefundene Diosgenin-Gehalt von ~0,1 γ/mg Trockengewicht ist, verglichen mit dem Steroid-Spiegel der Dioscorea-Knollen, niedrig. Zum Vergleich mögen die von BLUNDEN u. HARDMAN (1964) für Dioscorea-villosa-Knollen mit 7 bis 11% und für Dioscorea-belizensis-Knollen mit 6 bis 26% Diosgenin, bezogen auf das Trockengewicht, angegebenen Quantitäten dienen. Hingegen fällt der Wert von 0,1 γ Diosgenin/mg Trockengewicht in dieselbe Größenordnung, in der andere sekundäre Pflanzenstoffe (z.B.Nikotin in Konzentrationen von 0,1 bis 1,0 µg/mg Trockengewicht in Tabakgewebekulturen; SPEAKE u.Mitarbeiter, 1964)

in Gewebekulturen vertreten sind.

Es war ursprünglich die Absicht verfolgt worden, mit Hilfe von Verbindungen, die am Anfang des Steroid-Synthese-Weges liegen (Natrium-Acetat und Mevalonsäure), den Steroid-Spiegel der Gewebekulturen anzuheben und so die Steroid-Ausbeute zu erhöhen. Diese Praktik wäre in dem Falle erfolgversprechend, in dem der entsprechende Praecursor wegen Blockierung im Enzymsystem nicht synthetisiert werden kann (was hier aber offensichtlich möglich ist,da die Diosgenin-Synthese im Kallus stattfindet), oder der Praecursor selbst limitierender Faktor ist. Auf Grund dieser Überlegungen wurden in der vorliegenden Arbeit Fütterungsversuche durchgeführt. Nach vierwöchiger Kultur der Gewebe auf den mit Na-Acetat und Mevalonsäure versetzten Medien ergaben die Analysen unveränderte Werte von ~0,1 γ Diosgenin/mg Trockengewicht.

Es liegen Publikationen über Fütterungsversuche mit markierten Substanzen vor, die vor allem mit dem Ziel durchgeführt wurden, die Sterin-Biosynthese sowohl in ganzen Pflanzen als auch in Gewebekulturen aufzuzeigen (GOAD u. GOODWIN, 1966). Diese Untersuchungen erbrachten gleichzeitig Resultate über Synthese-Bedingungen: Die Autoren konnten nachweisen, daß unter anaeroben Bedingungen die Incorporation von (2- ^{14}C)-Mevalonat in die unverseifbaren Lipide drastisch vermindert wird, daß es zu einer Anhäufung von Squalen kommt und daß die Zyklisierung von Squalen zu Sterol nicht erfolgt. Auch BENVENISTE, DURR, HIRTH u. OURISSON (1964) haben eine Anhäufung von Squalen in anaeroben Gewebekulturen von Nicotiona tabacum bemerkt.

In einer neueren Untersuchung (BENVENISTE, HIRTH, OURISSON, 1966) verwandten die Autoren 1- ^{14}C-Acetat und

$^{14}CH_3$-Methionin und stellten unter Sauerstoffausschluß wiederum eine Anhäufung von markiertem Squalen und eine Hemmung der Sterinbiosynthese in Tabakgewebekulturen fest.

GOAD u. GOODWIN (1966) weisen darauf hin, daß der Grund für die Verminderung der Incorporation von (2- ^{14}C)-Mevalonat in die nichtverseifbaren Lipide unbekannt sei. Sie vermuten, daß möglicherweise Sauerstoff erforderlich ist für die Aufnahme und den Transport von Mevalonat oder für die Produktion von Cofaktoren.

Es wäre denkbar, daß in den hier durchgeführten Untersuchungen der Sauerstoffvorrat unter den gewählten Versuchsbedingungen (Agar-Nährböden, fest verschlossene Kulturröhrchen ohne Frischluftzufuhr) nicht optimal war. Diese Vermutung ist wohl unwahrscheinlich, aber trotzdem nicht ganz auszuschließen. Eine Überprüfung dieser Verhältnisse könnte klären, ob in diesen Versuchen Sauerstoff tatsächlich ein limitierender Faktor war und daher der Diosgenin-Gehalt in den Gewebekulturen relativ niedrig blieb und könnte gleichzeitig die Ursache aufzeigen, weshalb in den Fütterungsversuchen mit Natrium-Acetat und Mevalonsäure der Einfluß auf die Steroidsynthese ausblieb. Möglichkeiten der sterilen Belüftung sind technisch für Submerskulturen erprobt und ohne weiteres durchführbar. Für zukünftige Versuche sollte daher von Agar-Kulturen auf Flüssigkeitskulturen übergewechselt werden, wobei zusätzlich der Vorteil gegeben ist, daß mit größeren Volumina gearbeitet werden kann.

Weitere Bemühungen sollten auf eine Steigerung der Wachstumsrate ausgerichtet sein, womit gleichzeitig wahrscheinlich eine größere Steroid-Ausbeute erreicht werden könnte. Denn bei zwar gleichbleibendem prozentualen Diosgenin-Anteil würden Gewebekulturen mit größerem Zuwachs

letztlich zugleich über einen höheren Steroid-Gesamtgehalt verfügen.

Die mit der hier angewandten Methode erzielte Wachstumszunahme des steroidhaltigen Dioscorea-Kallus um das Siebenfache innerhalb der vierwöchigen Kulturperiode liefert bereits eine Basis und Material, das für die Praxis genutzt werden kann.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

A. Dioscorea:

1.) Kallusinduktion ist an Knollen- und Blattexplantaten nicht gelungen.

Kallusinduktion ist möglich an (Hypocotyl + Vegetationskegel)-Explantaten, isolierten Wurzeln und intakten Pflanzen.

An den intakten Pflanzen treten unter Wuchsstoffeinfluß Kalli an sämtlichen Organen auf. Diese Kalli können explantiert und über lange Versuchszeiträume mit unvermindertem Wachstum subkultiviert werden.

2.) Das Basalmedium nach MURASHIGE u. SKOOG (1962), modifiziert durch die Zusatzkomponenten 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml, ist sowohl für die Kallusinduktion als auch für die Subkultur am besten geeignet.

3.) Die Regeneration von Wurzeln an den explantierten Organen und Kalli kann unterdrückt werden durch regelmäßige, hohe Wuchsstoffgaben in den Konzentrationen von 10^{-6} g/ml.

4.) Selbst nach Hemmung der morphogenetischen Differenzierungsprozesse bleibt die Fähigkeit zur Steroidsynthese weiterhin erhalten.

5.) Die Diosgenin-Synthese-Leistung ist in den Kalli verschiedener Ursprungsgewebe und bei fortdauernder Subkultur gleichbleibend hoch (≈ 0,1 % Diosgenin/mg Trockengewicht).

6.) Der Diosgenin-Gehalt ist mit dem Wachstum korreliert und steigt parallel mit der Trockengewichtszunahme an.

7.) a) Licht- und Dunkelturen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Diosgenin-Synthese-Leistung nur geringfügig.

b) Kallusinduktion ist bei Dunkelkulturen leichter hervorzurufen als an Lichtkulturen.

c) Die Wachstumsgeschwindigkeit der Kalli ist im Dunkeln höher als im Licht.

8.) Fütterung von Na-Acetat und Mevalonsäure führt zu keiner statistisch gesicherten Förderung der Diosgenin-Synthese. Ein fördernder Einfluß von Natriumacetat ist vielleicht nicht ganz auszuschließen.

B. Solanum laciniatum Ait. (Syn. aviculare Forst.):

1.) Morphogenese und Solasodin-Synthese werden in intakten Pflanzen bis zum Alter von sechs Wochen kontinuierlich untersucht.

2.) Das Hypocotyl und die Sekundärblätter sechs Wochen alter Solanum-Pflanzen liefern wegen ihres relativ hohen Solasodin-Gehaltes das Ausgangsmaterial zur Kallusinduktion.

3.) a) Kallusbildung, die an 20% der intakten Solanum-Pflanzen spontan auftrat, konnte durch Zusätze von Auxin, Kinetin, Hefeextrakt und Cocosnußmilch gefördert werden, ebenso wie die Neigung zu Regene-

rationsleistungen unterdrückt werden konnte. Für beide Prozesse war das Basalmedium nach MURASHIGE und SKOOG (1962), ergänzt durch die Zusatzkomponenten 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml, am besten geeignet. Erst das Zusammenwirken beider Wuchsstoffkomponenten ermöglichte optimale Zuwachsraten bei gleichzeitiger Unterdrückung der Sproß- und Wurzelregeneration.

b) Die Regenerationsleistungen wurden antagonistisch beeinflußt:

Das Auxin hemmte die kinetin-induzierte Sproßbildung völlig, und das Kinetin vermochte die unter Auxin-Einfluß erhalten gebliebene Fähigkeit zur Wurzelregeneration um 50% herabzusetzen.

c) Durch Selektion dedifferenzierten Gewebes für die Subkultur konnten homogen wachsende Kalli gewonnen werden.

4.) Der Solasodin-Spiegel sank unmittelbar nach der Explantation der Pflanzenorgane. In isolierten Sekundärblättern konnte in der vierten Kulturwoche und in Hypocotyl-Explantaten in der fünften Woche das Solasodin nicht mehr erfaßt werden.

5.) Durch Fütterung von Natrium-Acetat und Mevalonsäure konnte die Steroidsynthese im Solasodin-freien Kallus nicht angeregt werden.

Literaturverzeichnis:

ALLSOPP,A: The metabolic status and morphogenesis. Phytomorphology 14, 1-27 (1964).

BEDOUR,M. S., D. EL-MUNAJJED, M. B. E. FAYEZ and A. N. GIRGIS: Steroid sapogenins. VII. Identification and origin of 25D-spirosta-3,5-diene among the fenugreek sapogenins. J. pharm. Sci. 53, 1276-1278 (1964).

BENVENISTE, P., DURR, A., HIRTH, L. et G. OURISSON: La biosynthèse des sterols dans les cultures de tissus de Tabac. Mise en évidence de substance à marquage rapide et identification du squalène. C. R. Acad. Sci. (Paris) 259, 2005-2008 (1964).

BENVENISTE, P. L. HIRTH et G. OURISSON: Biosynthèse des stéroides dans les cultures de tissus végétaux. Mise en évidence de sterols dans les cultures de tissus de Tabac et remarques sur leur biosynthès. C. R. Acad. Sci. (Paris) 258, 5515-5518 (1964).

BENVENISTE, P. L. HIRTH et G. OURISSON: La biosynthèse des sterols dans les tissus de tabac cultivés in vitro. I. Isolement de sterols et de triterpènes. Phytochemistry 5, 31-44 (1966).

BENVENISTE, P. L. HIRTH et G. OURISSON: La biosynthèse des stérols dans les tissus de tabac cultivés in vitro.II. Particularités

de la biosynthèse des phytosterols des tissus de tabac cultivés in vitro. Phytochemistry 5, 45-58 (1966).

BLUNDEN, G. and R. HARDMAN: Thin-layer chromatography of Dioscorea sapogenins. J. Chromatogr. (Amsterdam) 15, 273-276 (1964).

BRADY L. R. and V. E. TYLER: Biosynthesis of Hordenine in Tissue Homogenates of Panicum miliaceum L. Plant Physiol. 33, 334-338 (1958).

BÜNNING, E.: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1953).

CHAN, W. N. and E. J. STABA: A study of the chemical similarities of Datura tissue cultures and Datura plants by thin-layer chromatography. Am. Pharm. Assoc. Abstracts No. 149, New York City Meeting.

DAS, N. K., K. PÄTAU and F. SKOOG: Initiation of mitosis and cell division by kinetin and indolacetic acid in excised tobacco pith tissue. Physiol. plantarum (Kbh.) 9, 640-651, (1956).

ENGELBRECHT, L. und K. MOTHES: Kinetin als Faktor der Hitzeresistenz. Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. 73, 246-257 (1960).

ENGELBRECHT, L.: Beiträge zum Problem der Akkumulation von Aminosäuren in Blattzellen. Flora 150, 73-86 (1961).

ENGELBRECHT, L. und K. MOTHES: Weitere Untersuchungen zur experimentellen Beeinflussung der Hitzewirkung bei Blättern von Nicotiana rustica. Flora 154, 279-298 (1964).

FELLENBERG, G.: Über Organbildung an in vitro kultiviertem Knollengewebe von Solanum tuberosum. Z. Bot. 51, 113-141 (1963).

GAUTHERET, R. J.: La culture des tissus végétaux. Masson et Cie., Paris (1959).

GOAD, L. and T. W. GOODWIN: The Biosynthesis of Sterols in Higher Plants. Biochem. J. 99, 735-746 (1966).

HELLER, R.: Recherches sur la nutrition minérale de tissus végétaux cultivées in vitro. Ann. Sci. natur., Bot. Bio. végétale, 14, 1 (1953).

LETHAM, D. S., J. S. SHANNON and I. R. Mac DONALD: A Synthesis of Zeatin. Proc. chem. Soc. (Lond.), S. 230 (1964).

MOTHES, K.: Über das Altern der Blätter und die Möglichkeit ihrer Wiederverjüngung. Naturwiss. 47, 337-351 (1960).

MOTHES, K., I. RICHTER, K. STOLLE und D. GRÖGER: Physiologische Bedingungen der Alkaloidsynthese bei Catharanthus roseus G. Don. Naturwiss. 52, 431 (1965).

MURASHIGE, T.: Supression of Shoot Formation in Cultured Tobacco Cells by Gibberellic Acid.
Science 134, 280-281 (1961).

MURASHIGE, T.: Analysis of Inhibition of Organ Formation in Tobacco Tissue Cultures by Gibberellin.
Physiol. Plant. 17, 636-643 (1964).

MURASHIGE, T. and F. SKOOG: A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures.
Physiol. Plant. 15, 473-497 (1962).

NÉTIEN, G. et Jaqueline COMBET: Obtention de tissus de tige Datura Methel L. cultivés in vitro: modifications biochimiques azotées.
C. R. Acad. Sci. (Paris) Sér. D, 262, 1084-1086 (1966).

NEUBAUER, D.: Zum Auftreten der wichtigsten Alkaloide des Mohns in den einzelnen Organen und in verschiedenen Entwicklungsstadien.
Planta med. (Stuttg.) 12, 43-50 (1964).

NEUMANN, D. und H. K. TSCHÖPPE: Abbau von Solanaceen-Alkaloiden in höheren Pflanzen.
Flora 156, 521-542 (1966).

PÄTAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Meßreihen.
Biol. Zentrlbl. 63, 152 (1943).

PÄTAU, K., N. K. DAS and F. SKOOG: Induction of DNA synthesis by kinetin and indolacetic acid in excised tobacco pith tissue.
Physiol. plantarum (Kbh.) 10, 949-966 (1957).

PAUPARDIN, C.: Recherches préliminaires sur le compartement de l'oxalate de calcium dans des tissus végétaux cultivés in vitro.
Rev. Cytol. Biol. vég. 27, 253-257, (1964).

PRESTON, W. H. jr., J. R. HAUN, J. W. GARVIN and R. J. DAUM: Several aspects of growth, development and saponin yield of tubers of Dioscorea spiculiflora.
Econom. Bot. 18, 323-328 (1964).

RAGHAVON, V. and J. G. TORREY: Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of Capsella in culture.
Plant physiol. 39, 691-699 (1964).

RAM, H. Y. M. and F. C. STEWARD: The induction of growth in explanted tissue of the banana fruit.
Canad. J. Bot. 42, 1559-1579 (1964).

RICHTER, I., K. STOLLE, D. GRÖGER und K. MOTHES: Über Alkaloidbildung in Gewebekulturen von Catharanthus roseus G. Don.
Naturwiss. 52, 305-306 (1965).

RISSER, P. G. and P. R. WHITE: Nutritional requirements of spruce tumor cells in vitro.
Physiol. plantarum (Kbh.) 17, 620-635, (1964).

SCHRAUDOLF, H. und J. REINERT: Interaction of Plant Growth regulators in Regeneration Processes.
Nature 184, 465-466(1959).

SHANTZ, E. M. and F. C. STEWARE: Coconut milk factor: the growth promoting substances in coconut milk.
J. Amer. Chem. Soc. 74, 6133-6135 (1952).

SHANTZ, E. M., and F. C. STEWARD: The identification of compound A from coconut milk as 1,3-diphenylurea.
J. Amer. chem. Soc. 77, 6351 (1955).

SKOOG, F., and C. O. MILLER: Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissues Cultured in Vitro.
Symp. S. E. B. 11, 118-131 (1957).

SPEAKE, Th., P. Mc CLOSKEY and W. K. SMITH: Isolation of Nicotine from Cell Cultures of Nicotiana tabacum.
Nature (Lond.) 201, 614-615 (1964).

STAHL, E.: Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch.
Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg(1962)

TOCZKO u. Mitarb.: Acta biochim. polon. 7, 203 (1960), (zitiert nach NEUMANN u. TSCHÖPPE,1966).

TOPONI, M.: Action combinée de la kinétine et de l'acide indolacétique sur la néoformation d'organes par des fragments de feuilles d'endive.
C. R. Acad. Sci. (Paris) 257, 3030-3033, (1963).

TORREY, J. G. and J. REINERT: Suspension Cultures of Higher Plant Cells in Synthetic Media.
Plant Physiol. 36, 483-491 (1961).

WEST, F. R. jr. and E. S. MIKA: Synthesis of Atropine by Isolated Roots and Root-Callus Cultures of Belladonna. Bot. Gaz. 119, 50-54 (1957).

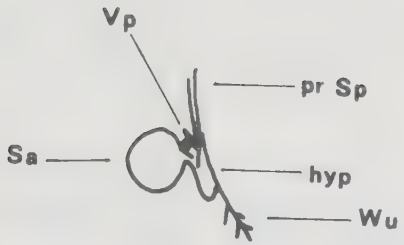
WHITE, Ph. R.: A handbook of plant tissue culture. Jaques Catell Press, Lancaster (1943).

WILLIAMS, B. L. and T. W. GOODWIN: The terpenoide of tissue cultures of Paul's scarlet rose. Phytochemistry 4, 81-88 (1965).

YAMADA,T.: Differentiation of roots and buds in flower tissue cultures in vitro. Kromosoma (Tokyo) 38, 1858-1859 (1963).

Graphische Darstellungen

Abb. 1:



Die Skizze zeigt den basalen Teil einer Dioscorea-Keimpflanze.

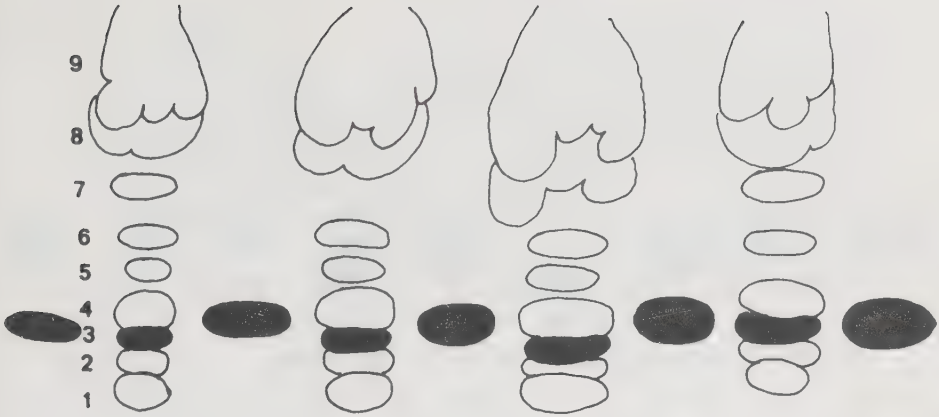
Sa = Samenschale, die den Cotyledo umgibt.
Vp = Vegetationspunkt
pr Sp = hypocotyles Glied
Wu = Wurzel

Berichtigung:
(Betr. Erläuterung der Abkürzungen der Abb. 1 auf Seite 67):

pr Sp = Primärsproß
hyp = hypocotyles Glied

Legende zu Abb. 2, S. 69:

Diosgenin-Chromatogramm:
Diosgenin-Standard = St (γ) und Diosgenin-Extrakt = E (µl) sind abwechselnd in verschiedenen Quantitäten aufgetragen worden. An einem Startpunkt (hier am vorletzten) sind zur zusätzlichen Kontrolle Extrakt und Reinsubstanz zusammen aufgetragen worden (hier E 25 µl + St 1γ).
Mit Nr 1 bis 9 sind die Flecken des aufgetrennten Extraktes beziffert, die unter der UV-Lampe (366 mµ) in charaktistischen Farben fluoreszieren.



St	E	St	E	St	E	St	E	St
0,5	25	1	50	2	100	5	25 + St 1	10

St Standard (γ)

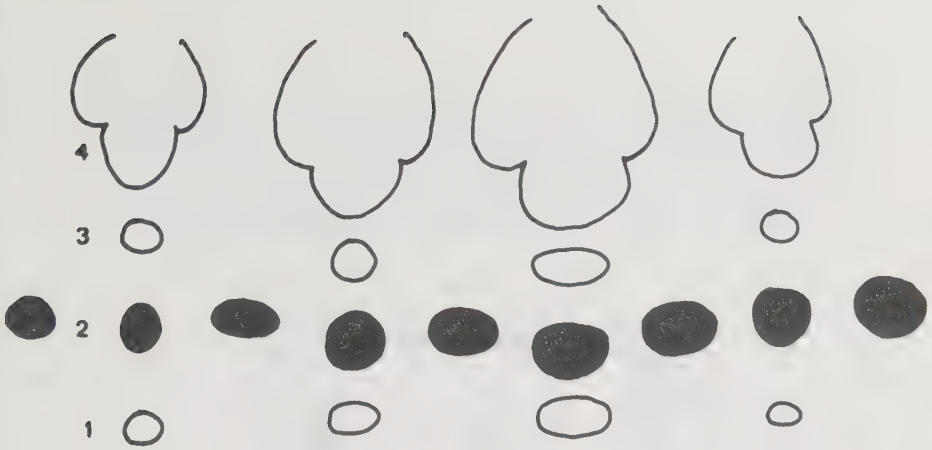
E Extrakt (µl)

1	gelb	4	rostrot	7	rosa
2	creme	5	rosa	8	blau = $\Delta^{3,5}$ Spirostadien
3	blau = Diosgenin	6	rosa	9	rosa

Abb. 2:
Diosgenin-Chromatogramm

Legende zu Abb. 3, S. 71:

Solasodin-Chromatogramm:
Solasodin-Standard = St (γ) und Solanum-Extrakt = E (µl) sind abwechselnd in verschiedenen Quantitäten aufgetragen worden. An einem Startpunkt (hier am vorletzten) sind zur zusätzlichen Kontrolle Extrakt und Reinsubstanz zusammen aufgetragen worden (hier E 20 µl + St 1 γ).
Mit Nr 1 bis 4 sind die Flecken des aufgetrennten Extraktes beziffert, die unter der UV-Lampe (366 mµ) in charakteristischen Farben fluoreszieren.



St	E	St	E	St	E	St	E + St	St
0,5	20	1	50	2	100	5	20 + 1	10

St = Standard (γ)

E = Extrakt (µl)

1 = rosa

2 = gelb = Solasodin

3 = rosa

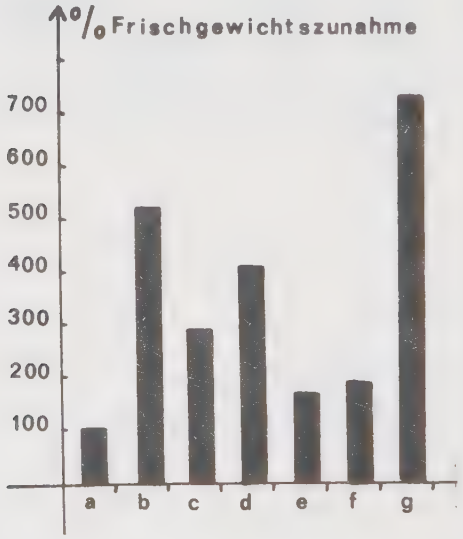
4 = rosa

Abb. 3:

Solasodin-Chromatogramm

Abb. 4a:

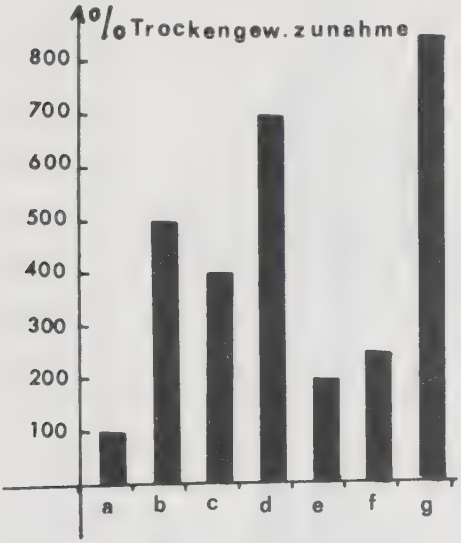
Frischgewichtszunahme von Dioscorea composita (Vp+Hyp)-Explantaten während sechswöchiger Kulturdauer bei 28°C im Dunkeln auf Medien verschiedener Zusammensetzung (Durchschnittswerte aus 20 Einzelmessungen):



a = Anfangsgewicht
b = BMW
c = BMW + 2,4-D, $6x10^{-7}$ g/ml
d = BMW + 2,4-D, $6x10^{-7}$ g/ml + 10% CoM
e = BMH
f = BMH + 2,4-D, $6x10^{-7}$ g/ml
g = BMH + 2,4-D, $6x10^{-7}$ g/ml + 18% CoM

Abb. 4b:

Trockengewichtszunahme von Dioscorea composita (Vp+Hyp)^{1} Explantaten während sechswöchiger Kulturdauer bei 28°C im Dunkeln auf Medien verschiedener Zusammensetzung (Mittelwerte aus 20 Einzelmessungen):



a = Anfangsgewicht
b = BMW
c = BMW + 2,4-D,10^{-7}g/ml
d = BMW + 2,4-D,10^{-7}g/ml + 10% CoM
e = BMH
f = BMH + 2,4-D,10^{-7}g/ml
g = BMH + 2,4-D,10^{-7}g/ml + 18% CoM

Abb. 5a und 5b:
Wachstum von Dioscorea-Keimwurzeln (Abb. 5a) und von Dioscorea-Keimlingen (Abb. 5b) nach sechswöchiger Kultur auf einem Basalmedium nach HELLER (BMH) mit verschiedenen Zusatzkomponenten, gemessen an der Frischgewichtszunahme (Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen).

Abb. 5a:

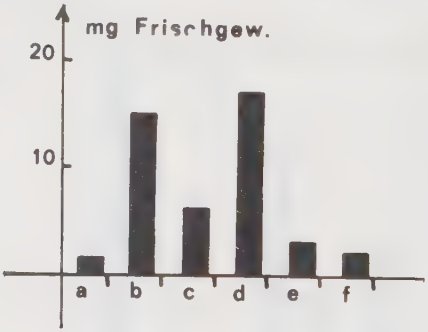
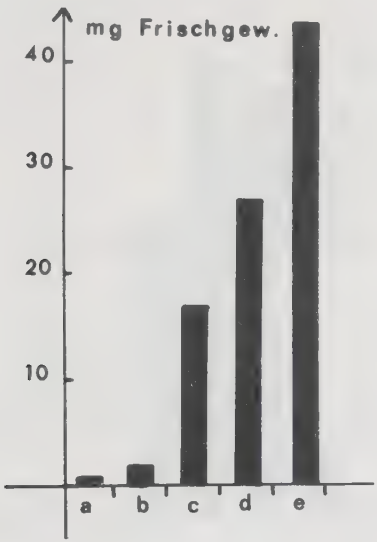


Abb. 5b:

a = Ausgangsgewicht
b = BMH + 2,4-D,10^{-5}g/ml + 18% CoM
c = BMH + 2,4-D,10^{-5}g/ml + 18% CoM + 0,001% C_2H_5SH
d = BMH + 2,4-D,10^{-5}g/ml + 18% CoM + Phosphat
e = BMH + 2,4-D,10^{-5}g/ml + Phosphat
f = BMH + 2,4-D,10^{-5}g/ml + 0,025% Hefe + Phosphat

Abb. 6a:

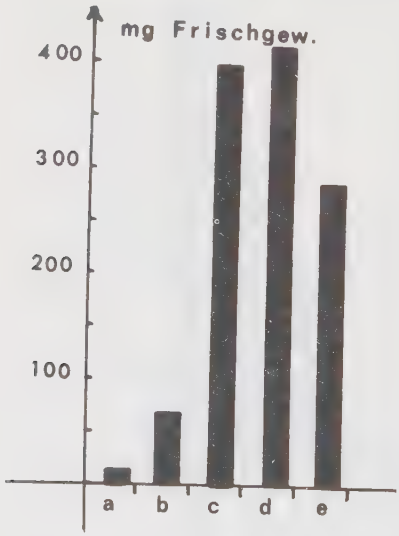
Wachstum von Dioscorea-Keimwurzeln nach sechswöchiger Kultur auf einem Basalmedium nach SKOOG (BMS) mit verschiedenen Zusatzkomponenten, gemessen an der Frischgewichtszunahme (Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen):



a = Ausgangsgewicht
b = BMS
c = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml
d = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-7} g/ml + 18% CoM
e = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-7} g/ml + 0,025% Hefe

Abb. 6b:

Wachstum von Dioscorea-Keimlingen nach sechswöchiger Kultur auf einem Basalmedium nach SKOOG (BMS) mit verschiedenen Zusatzkomponenten, gemessen an der Frischgewichtszunahme (Mittelwerte aus 20 Einzewägungen):



a = Ausgangsgewicht
b = BMS
c = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml
d = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-7} g/ml + 18% CoM
e = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-7} g/ml + 0,025% Hefe

Abb. 7a:
Wachstum von Dioscorea-Keimwurzeln nach sechswöchiger Kultur auf einem Basalmedium nach SKOOG (BMS) mit verschiedenen Zusatzkomponenten, gemessen an der Frischgewichtszunahme (Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen):

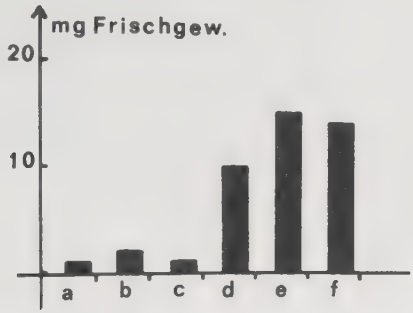
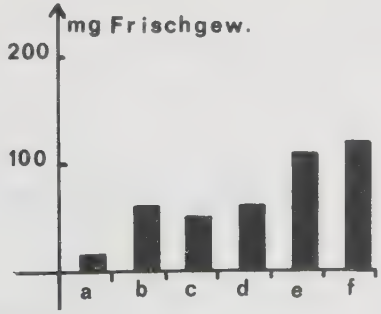


Abb. 7b:
Wachstum von Dioscorea-Keimlingen nach sechswöchiger Kultur auf einem Basalmedium nach SKOOG (BMS) mit verschiedenen Zusatzkomponenten, gemessen an der Frischgewichtszunahme (Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen):



a = Ausgangsgewicht
b = BMS
c = BMS + 2,4-D, 10^{-5} g/ml
d = BMS + 2,4-D, 10^{-5} g/ml + 18% CoM
e = BMS + 2,4-D, 10^{-5} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml + 18% CoM
f = BMS + 2,4-D, 10^{-5} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml + 0,025% Hefe

Abb. 8a:

Wachstum des Dioscorea-Hypocotyl-Kallus auf dem Medium BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml bei 28°C im Licht-Dunkel-Wechsel (12:12 Stdn., 2000 Lux).
Der Zuwachs wurde anfangs in 14-tägigen Abständen, später alle vier Wochen, an Kallusstücken von 100mg Ausgangsgewicht bestimmt. Nach der Ermittlung der Frischgewichtszunahme wurde das Gewebe wiederum auf 100 mg zurückgeschnitten und nach weiteren zwei bzw. vier Wochen erneut der Zuwachs bestimmt.
Die Kurvenpunkte sind Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen.

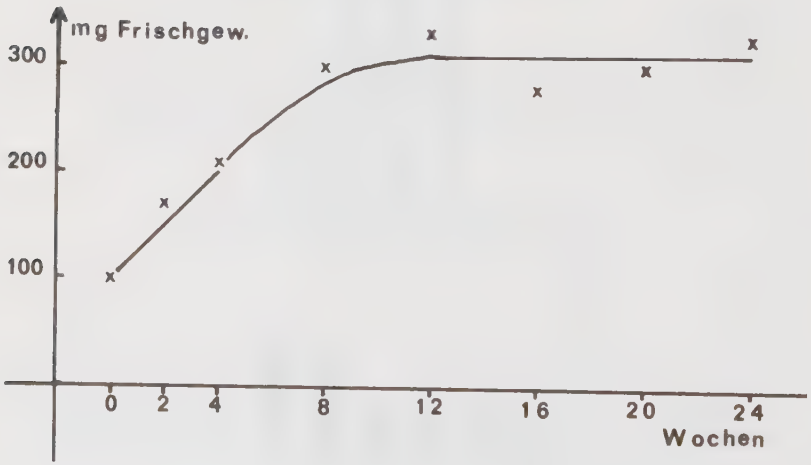
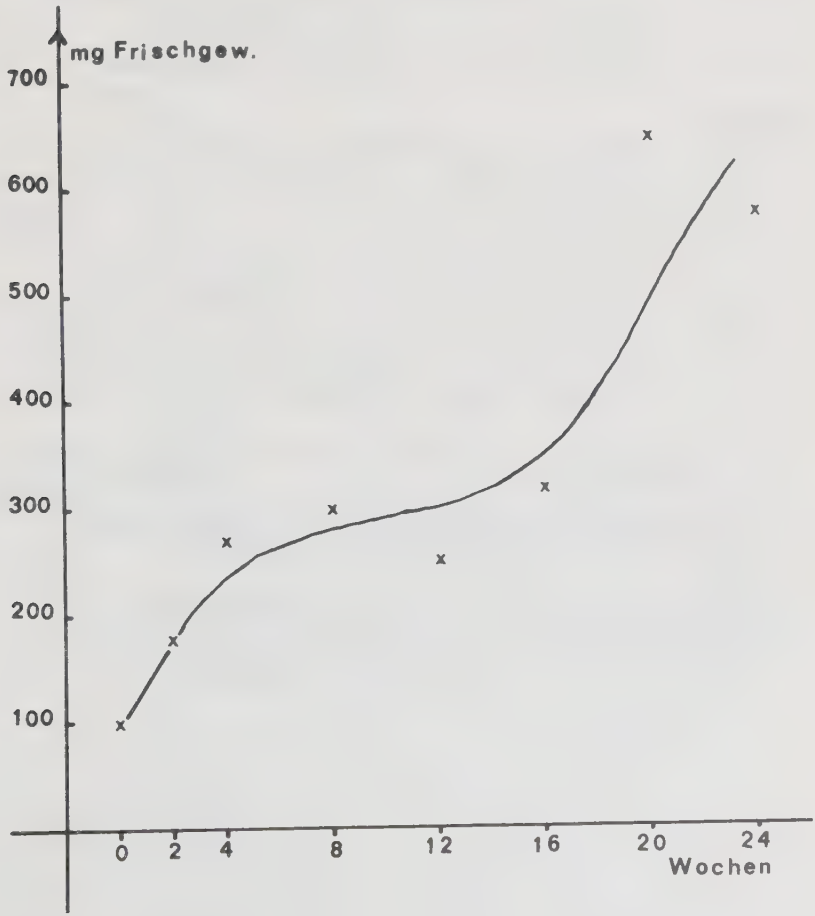


Abb. 8b:

Wachstum des Dioscorea-Hypocotyl-Kallus auf dem Medium BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml Bei 28°C im Dunkeln (Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen). (Einzelheiten über die Ermittlung des Zuwachses s. die Legende unter Abb. 8a, S. 78).



Legende zu Abb. 9a, 9b, 9c auf S. 81:

Abb. 9a:
Wachstum des Dioscorea-Hypocotyl-Kallus auf dem Medium BMS + 2,4-D,10^{-6}g/ml + Kinetin,10^{-6}g/ml bei 28°C im Dunkeln, gemessen an der Frischgewichtszunahme.

Abb. 9b:
Wachstum des Dioscorea-Hypocotyl-Kallus auf dem Medium BMS + 2,4-D,10^{-6}g/ml + Kinetin,10^{-6}g/ml bei 28°C im Dunkeln, gemessen an der Trockengewichtszunahme.

Abb. 9c:
Diosgenin-Gehalt des Dioscorea-Hypocotyl-Kallus bei Kultur auf dem Medium BMS + 2,4-D,10^{-6}g/ml + Kinetin, 10^{-6}g/ml bei 28°C im Dunkeln.

Die Frischgewichtszunahme (Abb. 9a) wurde alle vier Wochen an Kallusstücken von 100 mg Ausgangsgewicht bestimmt. Nach der Ermittlung des Zuwachses wurde das Gewebe wiederum auf 100 mg zurückgeschnitten und nach weiteren vier Wochen erneut der Zuwachs ermittelt.

Parallel dazu wurde an anderen Kulturen gleichen Alters das Trockengewicht bestimmt (Abb. 9b). Das gefriergetrocknete Gewebe diente als Material für die anschließend durchgeführten Diosgenin-Analysen (Abb. 9c).

Frischgewichte = Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen.
Trockengewichte =Mittelwerte aus 2 Einzelwägungen.
Diosgenin-Werte = Mittelwerte aus 2 Analysen.

Abb.9a

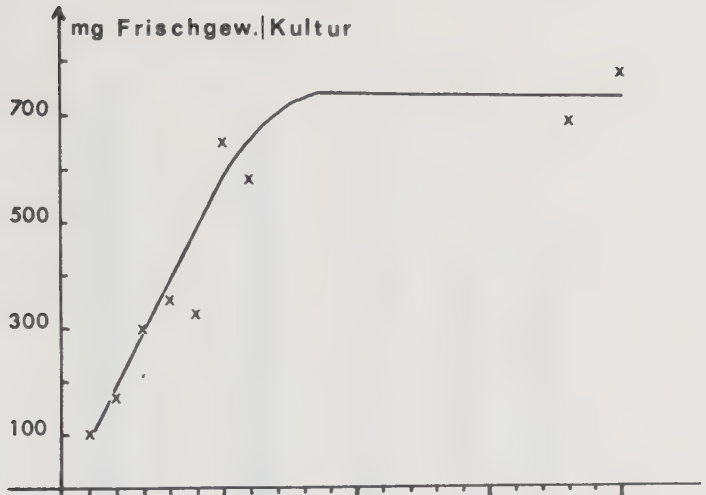


Abb.9b

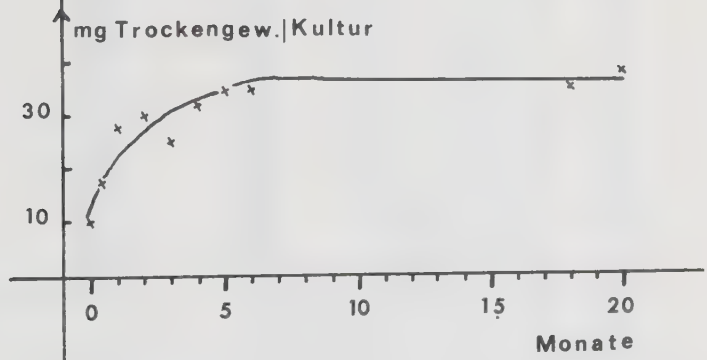
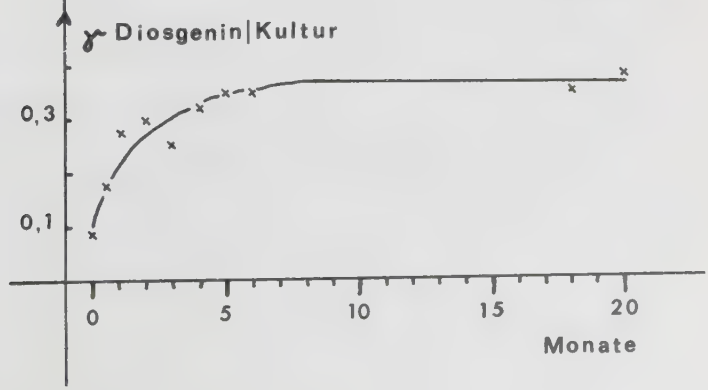


Abb.9c



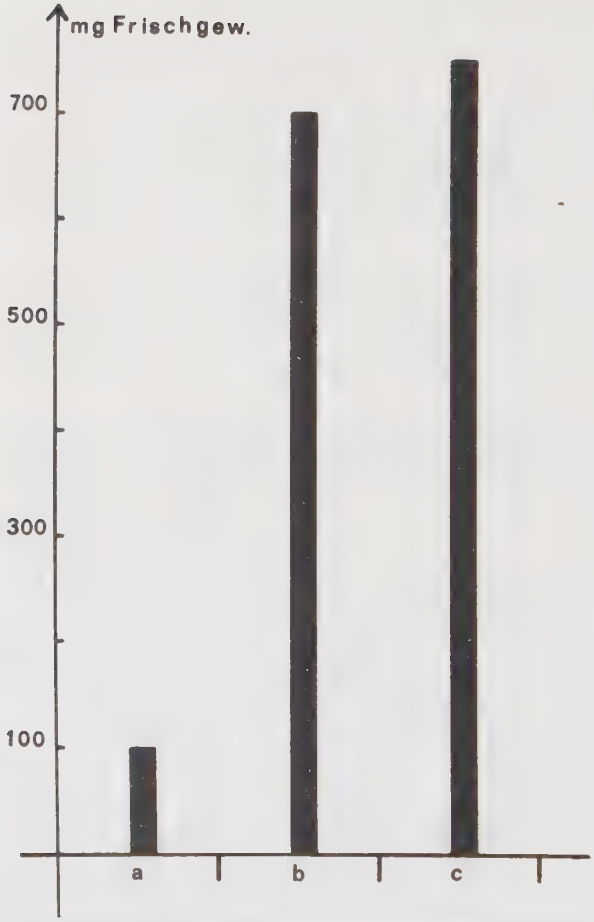


Abb. 10:

Frischgewichtszunahme des Dioscorea-Hypocotyl-Kallus innerhalb von vier Wochen auf BMS+2,4-D,10^{-6}g/ml+Kinetin, 10^{-6}g/ml bei 28°C.

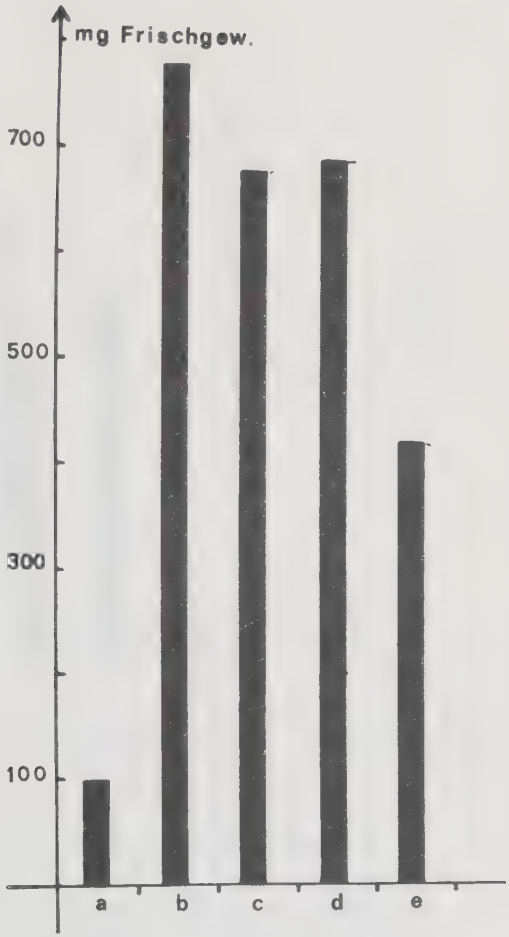
a = Ausgangsgewicht

b = ständig (= 18 Monate) im Dunkeln

c = 17 Monate im Dunkeln → 1 Monat im Licht

Abb. 11:

a = Ausgangsgew.
b = Hypocotyl-Kallus
c = Blattstiel-Kallus
d = Cotyledo-Kallus
e = Wurzel-Kallus



Frischgewichtszunahme 18 Monate alter Dioscorea composita-Gewebekulturen verschiedenen Ursprungs im Versuchszeitraum von vier Wochen bei Kultur auf dem Nährboden BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml bei 28°C im Dunkeln. (Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen).

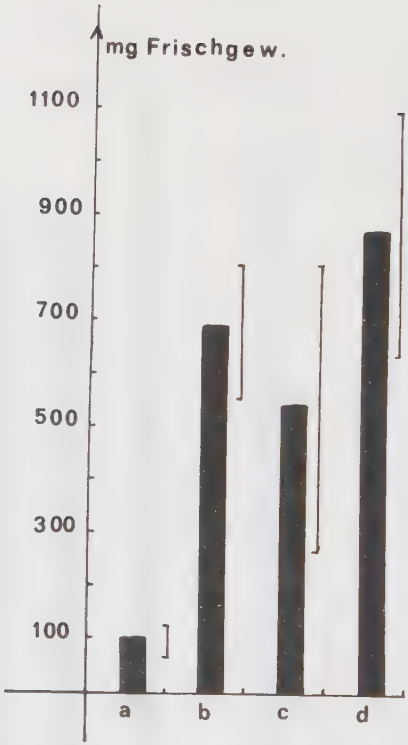


Abb. 12:

Frischgewichtszunahme des 1 1/2-jährigen Dioscorea-Hypocotyl-Kallus innerhalb von vier Wochen auf Nährböden mit Steroid-Praecursoren bei Kultur bei 28°C im Dunkeln (Mittelwerte aus je 20 Einzelwägungen mit den dazugehörigen dreifachen mittleren Fehlern).

a = Ausgangsgewicht

b = BMS+2,4-D,10^{-6}g/ml+Kinetin,10^{-6}g/ml

c = BMS+2,4-D,10^{-6}g/ml+Kinetin,10^{-6}g/ml+Natrium-Acetat,$2x10^{-6}$

d = BMS+2,4-D,10^{-6}g/ml+Kinetin,10^{-6}g/ml+Mevalonsäure,10^{-6}g/ml

Abb. 13a

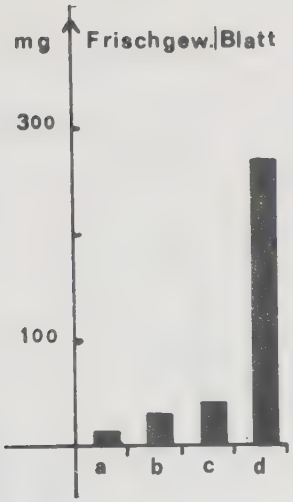
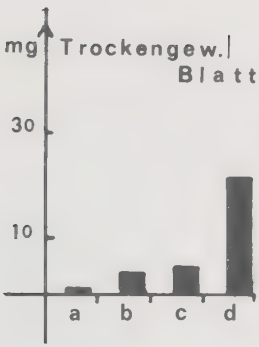


Abb. 13b



Frisch- und Trockengewichtszunahme der Solanum-Blatt-Explantate innerhalb von vier Wochen bei 28°C im 12:12 Stdn. Licht-Dunkel-Wechsel mit 2000 Lux in der Lichtperiode (Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen für das Frischgewicht und 2 Bestimmungen für das Trockengewicht).

a = Ausgangsgewicht
b = BMW + 2,4-D,10^{-6}g/ml + Kinetin,10^{-6}g/ml (WHITE)
c = BMW + 2,4-D,10^{-6}g/ml + Kinetin,10^{-6}g/ml (HELLER)
d = BMS + 2,4-D,10^{-6}g/ml + Kinetin,10^{-6}g/ml (SKOOG)

Abb.13c

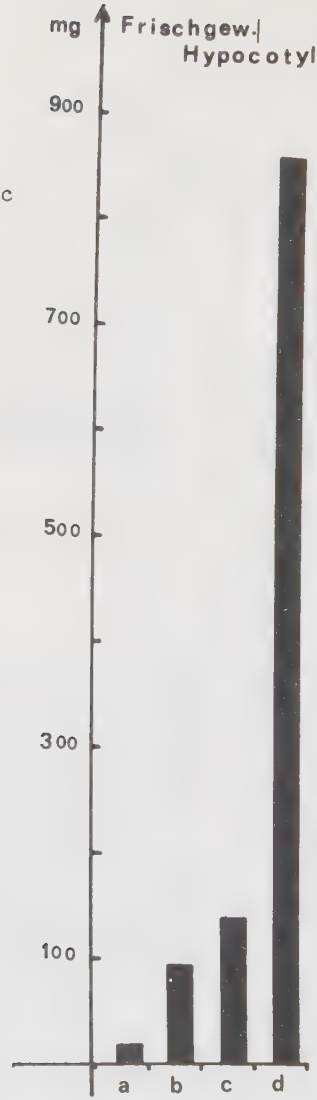


Abb.13d

Frisch- und Trockengewichtszunahme der Solanum-Hypocotyl-Explantate innerhalb von vier Wochen bei 28°C im 12:12 Stdn.-Licht-Dunkel-Wechsel mit 2000 Lux in der Lichtperiode. (Frischgew. = Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen, Trockengew.= Mittelwerte aus 2 Bestimmungen; Erklärung der Abkürzungen a, b, c, d, s. S. 85).

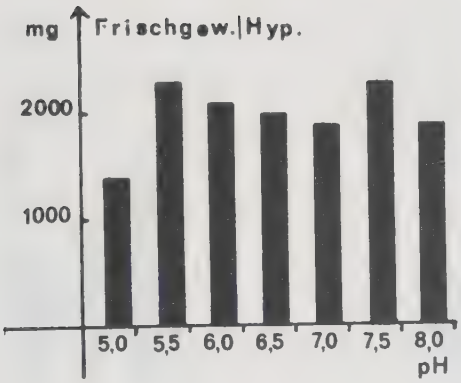


Abb. 14:

Wachstum von Solanum-Hypocotyl-Explantaten auf dem Nährboden BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml mit variiertem pH innerhalb von vier Wochen bei 28°C im 12:12 Stdn. Licht-Dunkel-Wechsel mit 2000 Lux in der Lichtperiode (Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen).

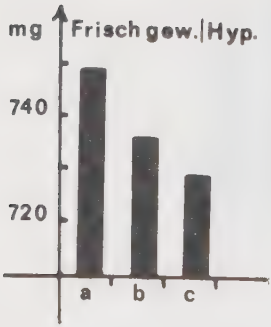


Abb. 15a

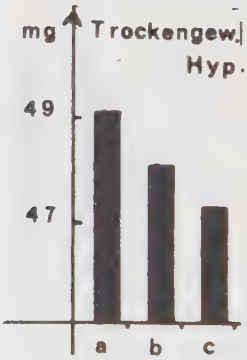


Abb. 15b

Wachstum der Solanum-Hypocotyl-Explantate innerhalb von vier Wochen auf Nährböden mit variierter Auxin-Konzentration bei 28°C im 12:12 Stdn. Licht-Dunkel-Wechsel mit 2000 Lux in der Lichtperiode.
(Frischgew. = Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen, Trockengew. = Mittelwerte aus 2 Bestimmungen).
a = BMS + 2,4-D, 10^{-7} g/ml
b = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml
c = BMS + 2,4-D, 10^{-5} g/ml

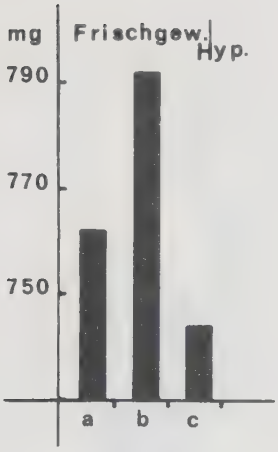


Abb. 16a

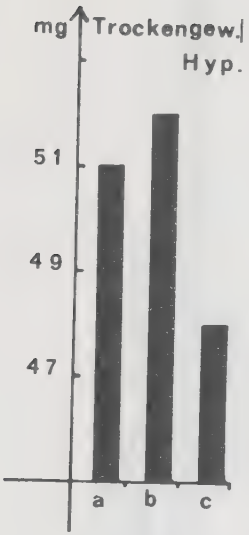


Abb. 16b

Wachstum der Solanum-Hypocotyl-Explantate innerhalb von vier Wochen auf Nährböden mit Hefeextrakt und Auxin verschiedener Konzentrationsstufen bei 28°C im 12:12 Stdn. Licht-Dunkel-Wechsel mit 2000 Lux in der Lichtperiode.
(Frischgew. = Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen, Trockengew. = Mittelwerte aus 2 Bestimmungen).
a = BMS + 2,4-D, 10^{-7} g/ml + 0,025% Hefe
b = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + 0,025% Hefe
c = BMS + 2,4-D, 10^{-5} g/ml + 0,025% Hefe

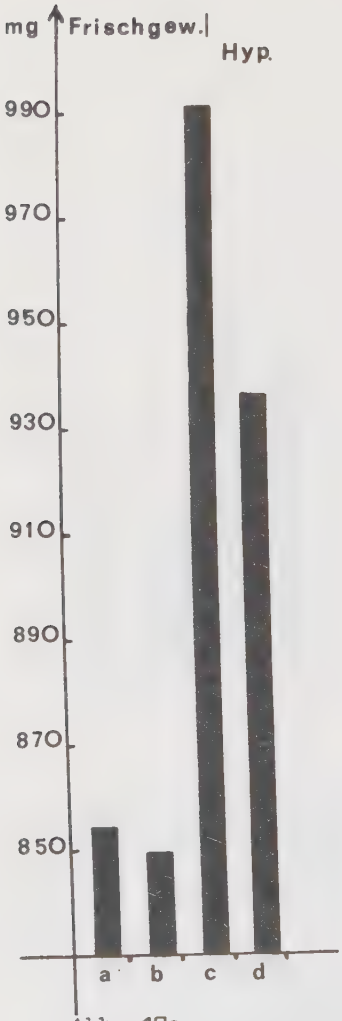


Abb. 17a

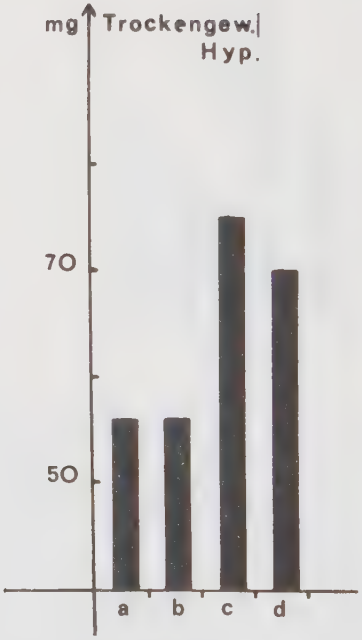


Abb. 17b

Wachstum der Solanum-Hypocotyl-Explantate innerhalb von vier Wochen aud Nährböden mit Cocosnußmilch verschiedener Konzentrationsstufen bei 28°C im 12:12 Stdn.-Licht-Dunkel-Wechsel mit 2000 Lux in der Lichtperiode. (Frischgew. = Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen, Trockengew. = Mittelwerte aus 2 Bestimmungen).

a = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + 5% CoM
b = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + 10% CoM
c = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + 15% CoM
d = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + 18% CoM

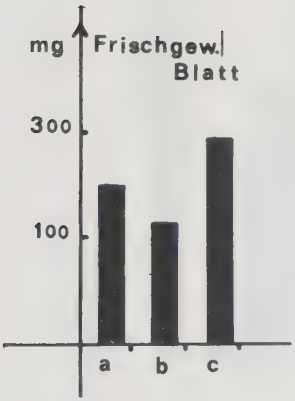


Abb. 18a

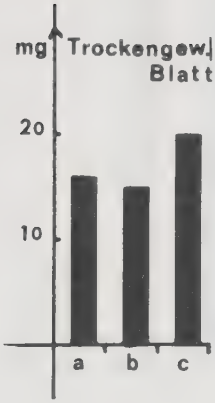


Abb. 18b

Wachstum der Solanum-Blatt-Explantate innerhalb von vier Wochen auf Nährböden mit verschiedenen Wuchsstoffkomponenten bei 28°C im 12:12 Stdn.-Licht-Dunkel-Wechsel mit 2000 Lux in der Lichtperiode. (Frischgew. = Mittelwert aus 20 Einzelwägungen, Trockengew. = Mittelwert aus 2 Bestimmungen).

a = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml --- ---
b = BMS --- --- + Kinetin, 10^{-6} g/ml
c = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml

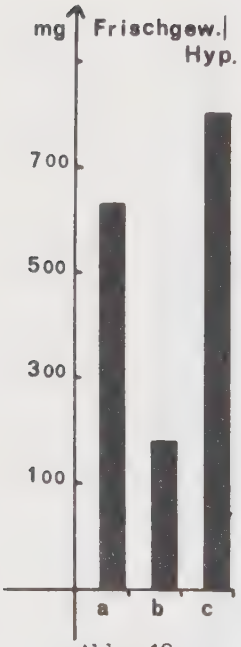


Abb. 18c

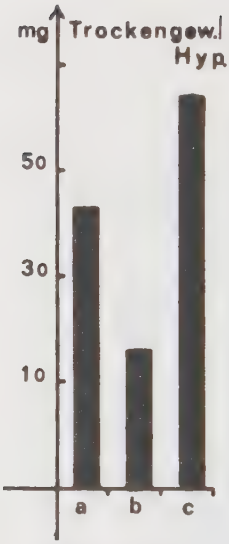


Abb. 18d

Wachstum der Solanum-Hypocotyl-Explantate innerhalb von vier Wochen auf Nährböden mit verschiedenen Wuchsstoffkomponenten bei 28°C im 12:12 Stdn.-Licht-Dunkel-Wechsel mit 2000 Lux in der Lichtperiode. (Frischgew. = Mittelwert aus 20 Einzelwägungen, Trockengew. = Mittelwert aus 2 Bestimmungen)!

a = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml --- ---

b = BMS + --- --- + Kinetin, 10^{-6} g/ml

c = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml

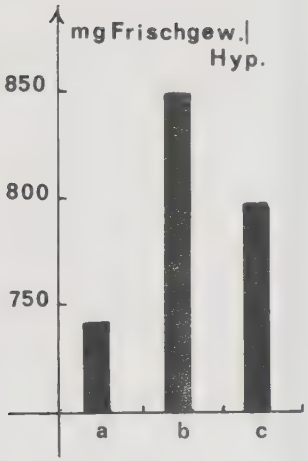


Abb. 19a

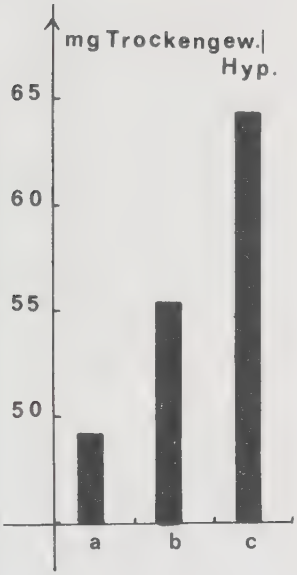


Abb. 19b

Wachstum der Solanum-Hypocotyl-Explantate innerhalb von vier Wochen auf Nährböden verschiedener Zusammensetzung bei 28°C im 12:12 Stdn.-Licht-Dunkel-Wechsel mit 2000 Lux in der Lichtperiode.
(Frischgew. = Mittelwerte aus 20 Einzelwägungen, Trockengew. = Mittelwerte aus 2 Bestimmungen).
a = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml
b = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + 10% CoM
c = BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml

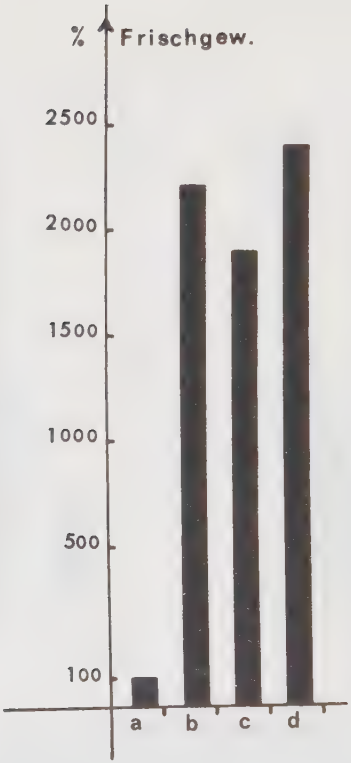


Abb. 20

Wachstum des 1 1/2 Jahre alten Solanum-Hypocotyl-Kallus innerhalb von vier Wochen auf Nährböden, die Steroid-Praecursoren enthielten, bei 28°C im 12:12 Stdn.-Licht-Dunkel-Wechsel mit 2000 Lux in der Lichtperiode. (Frischgewicht = Mittelwert aus 20 Einzelwägungen).

a = Ausgangsgewicht

b = BMS+2,4-D,10^{-6}g/ml+Kinetin,10^{-6}g/ml

c = BMS+2,4-D,10^{-6}g/ml+Kinetin,10^{-6}g/ml+Na-Acetat,$2x10^{-6}$g/ml

d = BMS+2,4-D,10^{-6}g/ml+Kinetin,10^{-6}g/ml+Mevalonsäure10^{-6}g/ml

Photographien

Bild 1 - 15 = behandelte Dioscorea-Pflanzen

Bild 1: 1 Woche auf BMS im Dunkeln.

Bild 2: 1 Woche auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml
im Dunkeln;
mit aufgequollenem Sproß und verdicktem Hypocotyl.

Bild 3: 1 Woche auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml
im Dunkeln;
mit aufgequollenem Sproß und verdickter Wurzelspitze.

Bild 1

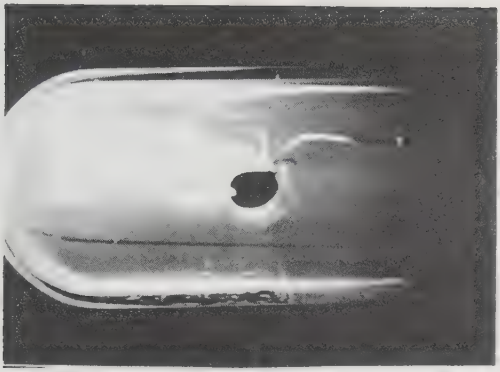


Bild 2

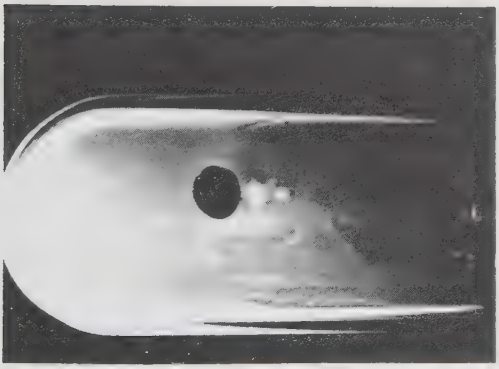


Bild 3

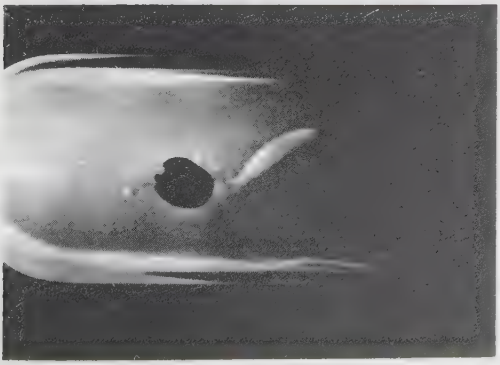


Bild 4: 8 Wochen auf BMS + 2,4-D,10^{-6}g/ml + Kinetin,10^{-6}g/ml im Dunkeln;
mit Kallus am basalen Teil des Blattstiels, in der Region des Hypocotyls + Vegetatiosnkegels und an der Wurzel.

Bild 5: 9 Wochen auf BMS + 2,4-D,10^{-6}g/ml + Kinetin,10^{-6}g/ml im Dunkeln;
mit Kallus in der Region des Hypocotyls + Vegetationskegels und an der Wurzel. Es sind sieben Adventivwurzeln entstanden, die größtenteils miteinander verwachsen sind.

Bild 6: 10 Wochen auf BMS + 2,4-D,10^{-6}g/ml + Kinetin,10^{-6}g/ml im Dunkeln;
mit Kallus am basalen Teil des Blattstieles, in der Region des Hypocotyls + Vegetationskegels und an der Wurzel.

Bild 4

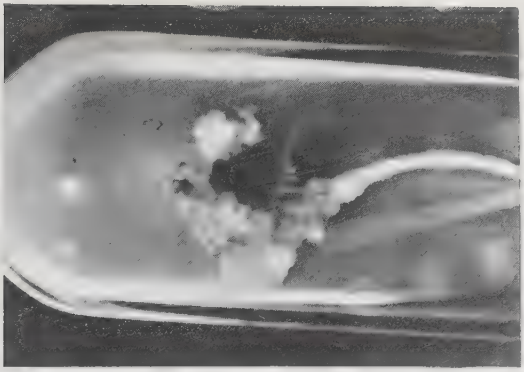


Bild 5

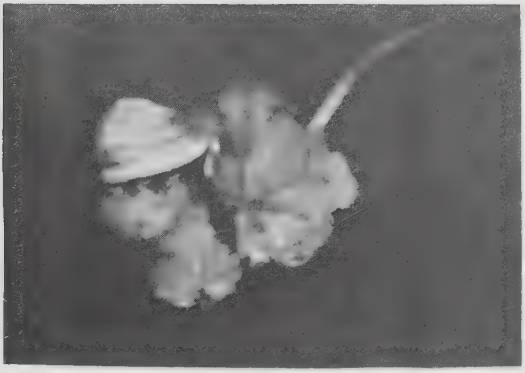


Bild 6

Bild 7: 10 Wochen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml im Dunkeln;
mit Kallus am apikalen und basalen Teil des Blattstieles und in der Region des Hypocotyls + Vegetationskegels.

Bild 8: 10 Wochen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml im Dunkeln;
die ganze Keimpflanze ist vom Kallus überwuchert.

Bild 9: 10 Wochen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml im Dunkeln;
der Blattstiel des Primärsprosses besteht noch aus organisiertem Gewebe; die übrigen Teile der Pflanze sind von üppigem Kallus überwuchert.

Bild 7

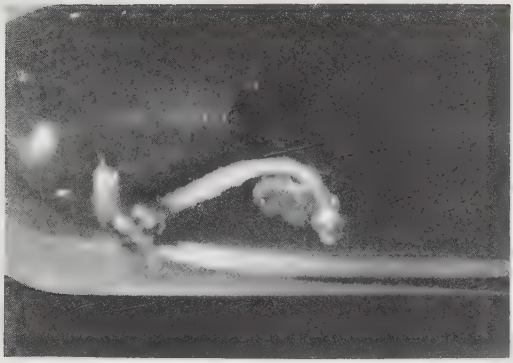


Bild 8

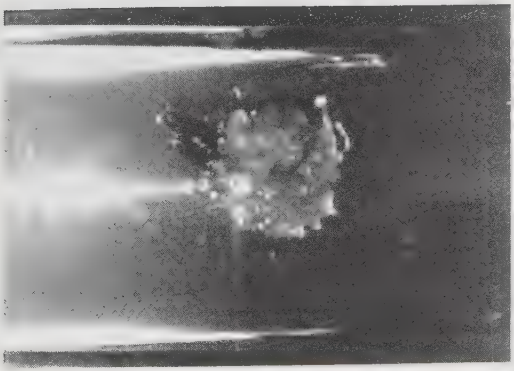


Bild 9

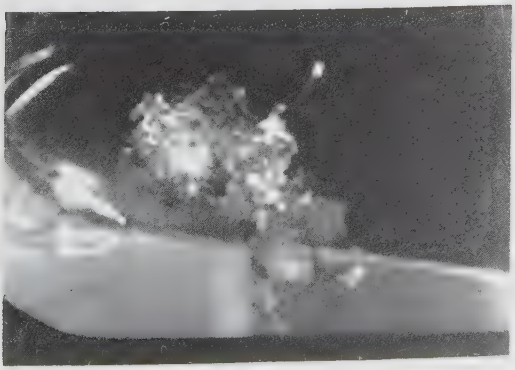


Bild 10: 8 Wochen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml im Licht/Dunkel;
es haben sich zwei Sprosse und unzählige Wurzeln entwickelt.

Bild 11: 10 Wochen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml im Licht/Dunkel;
mit Kallus am basalen Teil des Blattstiels, in der Region des Hypocotyls + Vegetationskegels und an der Wurzel.

Bild 12: 10 Wochen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml im Licht/Dunkel;
mit Kallus am gesamten Blattstiel, in der Region des Hypocotyls + Vegtationskegels; es sind ca. 15 Adventivwurzeln entstanden, die zum Teil dedifferenziert werden.

Bild. 10

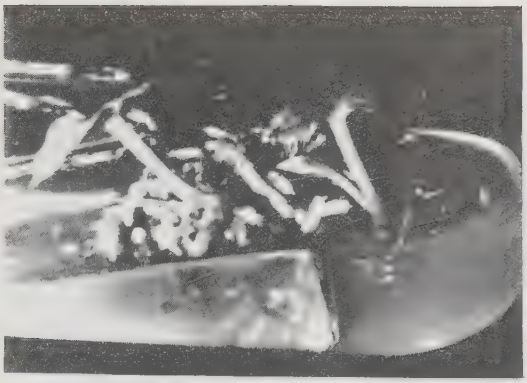


Bild. 11

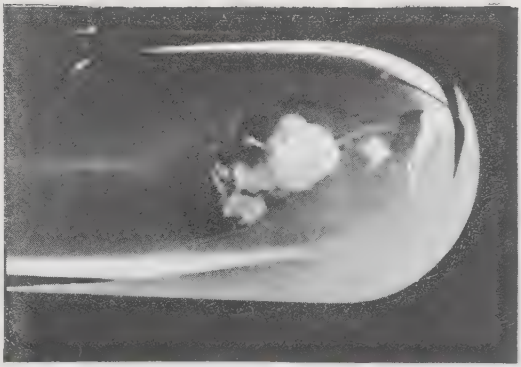


Bild. 12

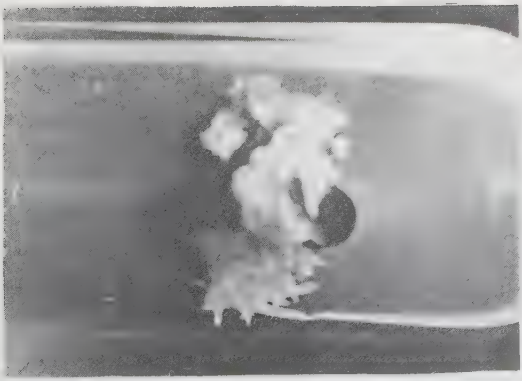


Bild 13: 8 Wochen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml im Licht/Dunkel;
mit Kallus an sämtlichen Teilen der Pflanze.

Bild 14: dito

Bild 15: 10 Wochen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml im Licht/Dunkel;
mit Kallus an sämtlichen Teilen der Pflanze; es wird deutlich, daß der proliferierende Cotyledo die Samenschale gesprengt hat.

Bild 13

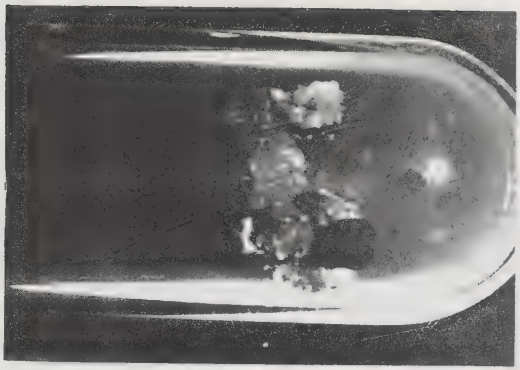


Bild 14

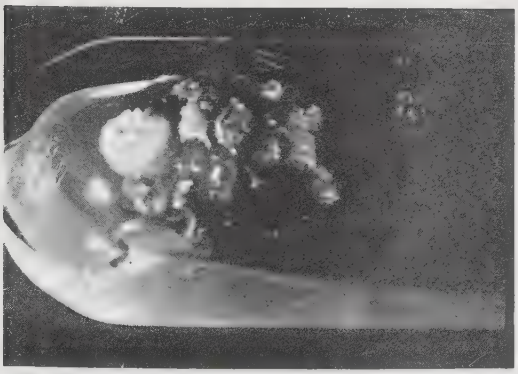


Bild 15

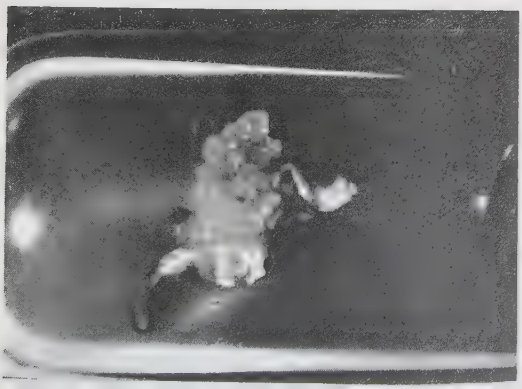


Bild 16 - 33 = behandelte Solanum-Explantate im Licht/Dunkel

Bild 16: Solanum-Sekundärblatt, 4 Wochen auf
BMW + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml

Bild 17: Solanum-Sekundärblatt, 4 Wochen auf
BMH + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml

Bild 18: BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml

Bild 16

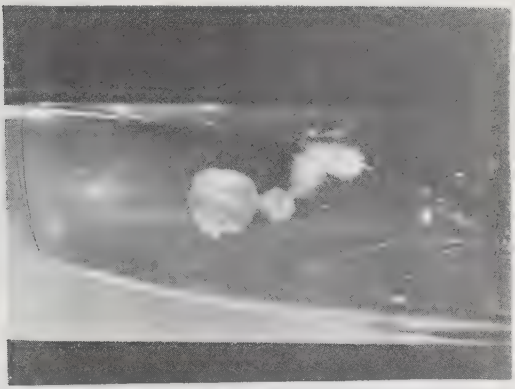


Bild 17

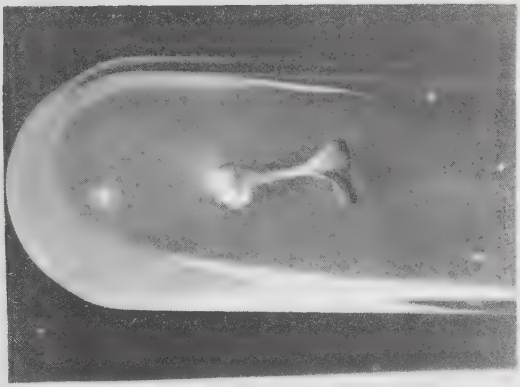


Bild 18

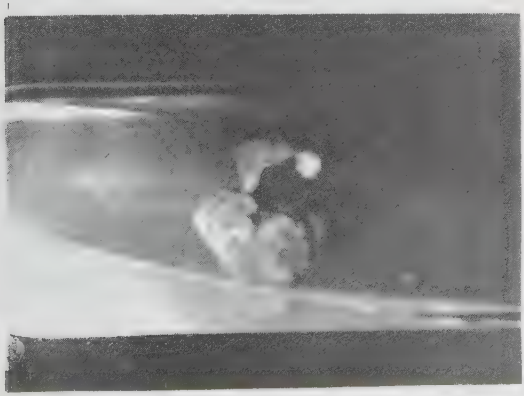


Bild 19: Solanum-Hypocotyl, 4 Wochen auf
BMW + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml

Bild 20: Solanum-Hypocotyl, 4 Wochen auf
BMH + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml

Bild 21: Solanum-Hypocotyl, 4 Wochen auf
BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml

Bild 19

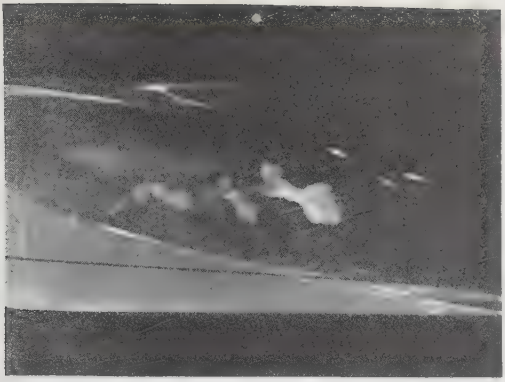


Bild 20

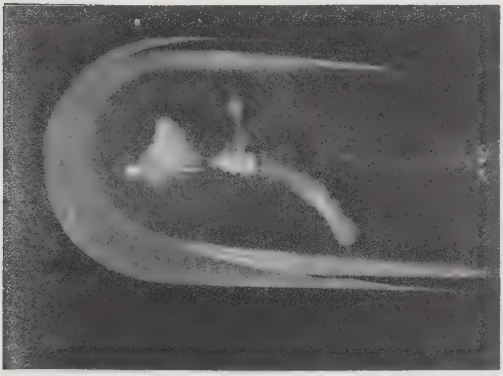


Bild 21

Bild 22: Solanum-Sekundärblatt, 4 Wochen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml.

Bild 23: Solanum-Sekundärblatt, 4 Wochen auf BMS + Kinetin, 10^{-6} g/ml.

Bild 24: Solanum-Sekundärblatt, 4 Wochen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml.

Bild 22

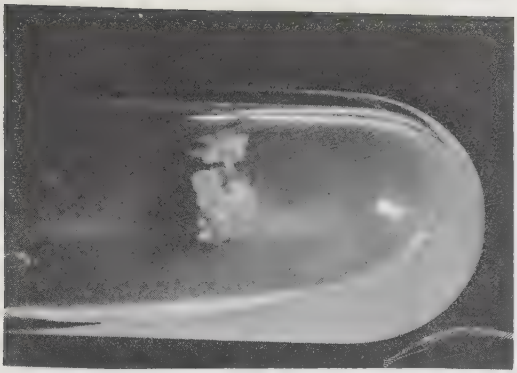


Bild 23

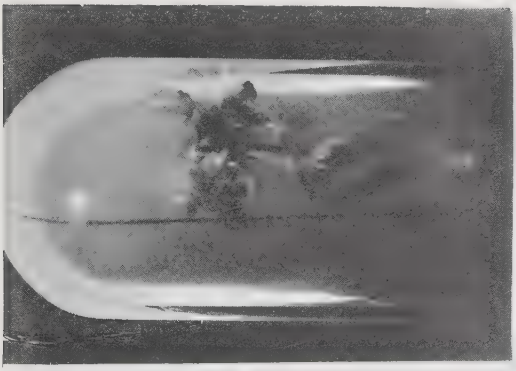


Bild 24

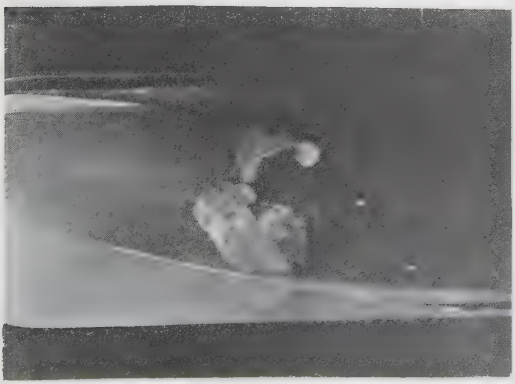


Bild 25: Solanum-Hypocotyl, 4 Wochen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml.

Bild 26: Solanum-Hypocotyl, 4 Wochen auf BMS + Kinetin, 10^{-6} g/ml.

Bild 27: Solanum-Hypocotyl, 4 Wochen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml.

Bild 25

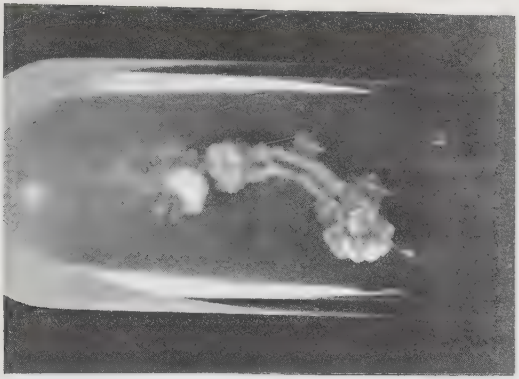


Bild 26

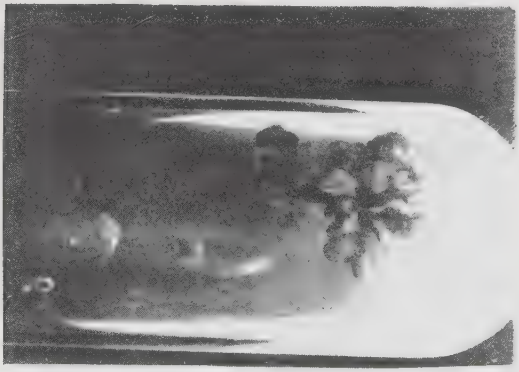


Bild 27

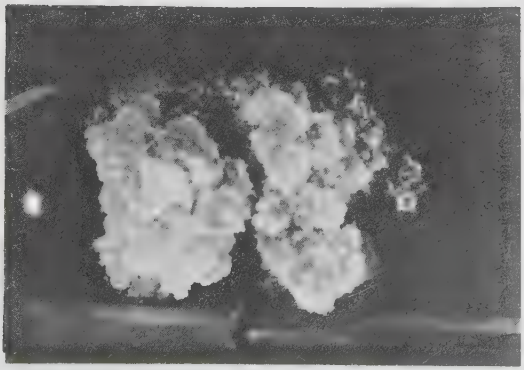


Bild 28: Solanum-Sekundärblatt, 1 Woche auf BMS + 2,4-D,10^{-6}g/ml + Kinetin,10^{-6}g/ml

Bild 29: Solanum-Sekundärblatt, 3 Wochen auf BMS + 2,4-D,10^{-6}g/ml + Kinetin,10^{-6}g/ml

Bild 30: Solanum-Sekundärblatt, 5 Wochen auf BMS + 2,4-D,10^{-6}g/ml + Kinetin,10^{-6}g/ml

Bild 28

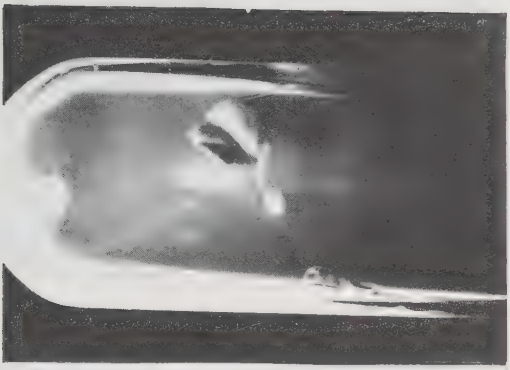


Bild 29

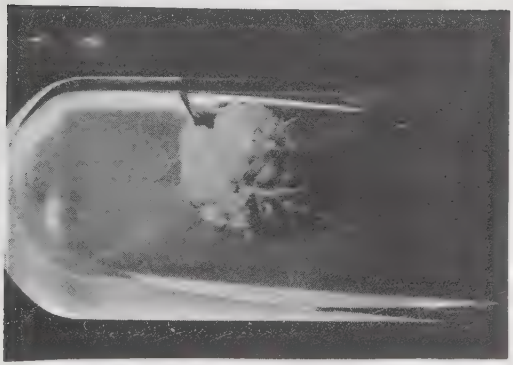


Bild 30

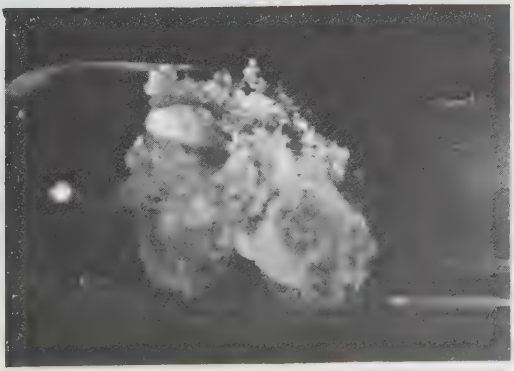


Bild 31: Solanum-Hypocotyl, 1 Woche auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml

Bild 32: Solanum-Hypocotyl, 3 Wochen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml

Bild 33: Solanum-Hypocotyl, 5 Wochen auf BMS + 2,4-D, 10^{-6} g/ml + Kinetin, 10^{-6} g/ml

Bild 31

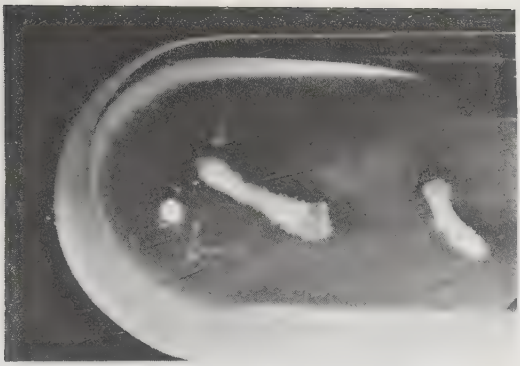


Bild 32

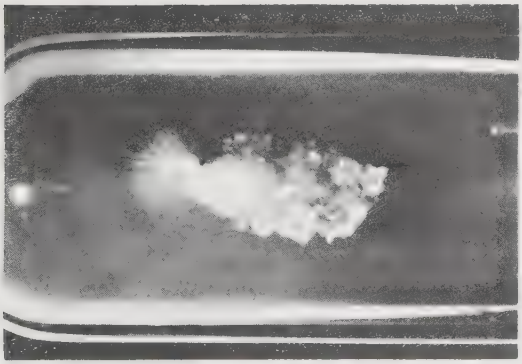
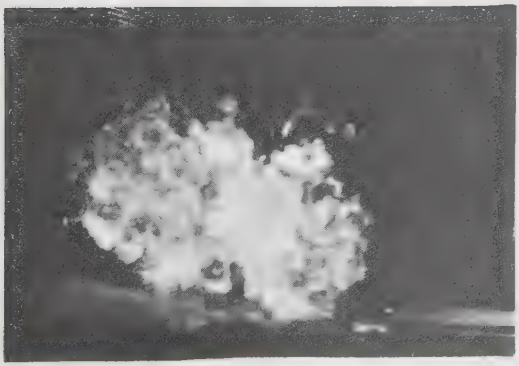


Bild 33



Die Arbeit wurde in den Jahren 1964 bis 1967
im Pflanzenphysiologischen Institut der
Freien Universität unter der Leitung von Herrn
Professor Dr. J. Reinert durchgeführt.

Die Firma SCHERING förderte und unterstützte
diese Arbeit auf die großzügigste Weise,
wofür ich an dieser Stelle meinen aufrichtigsten
Dank zum Ausdruck bringen möchte.

Lebenslauf

Am 20. Januar 1938 wurde ich, Ursula Hildegard Martha Grabow, als Tochter des Landwirts Arthur Grabow und seiner Ehefrau Hildegard Grabow, geb. Hahn, in Pritzwalk geboren.

Ich besuchte von 1944 bis 1952 die achtklassige Grundschule und anschließend die Oberschule in Pritzwalk. Im April 1953 wurde ich wegen Zugehörigkeit zur Ev. Jungen Gemeinde von der Oberschule verwiesen. Von 1953 bis 1958 ging ich auf die Robert-Blum-Schule (Neusprachliches und Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium) in Berlin-Schöneberg, wo ich am 5. März 1958 die Reifeprüfung bestand.

Im Sommersemester 1958 begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Botanik, studierte 1961 an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz, wo ich auch die Vordiplom-Prüfung ablegte und setzte das Studium im WS 1961/62 an der FU in Berlin fort. Hier bestand ich am 21. Februar 1964 die Hauptdiplom-Prüfung in Biologie. Seit dem Sommersemester 1964 bin ich Doktorandin am Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität.

Druck: Omnia - Organisation G. m. b. H.
Berlin 31 · Hohenzollerndamm 174
Telefon: 87 93 12